UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

LUIS AUGUSTO ESPER

Avaliação da cicatrização de defeitos ósseos criados cirurgicamente em calvárias de ratos tratados com regeneração óssea guiada e enxertos de origem bovina associados ou não ao laser de baixa intensidade. Estudo histológico e histométrico

BAURU
2015

LUIS AUGUSTO ESPER

Avaliação da cicatrização de defeitos ósseos criados cirurgicamente em calvárias de ratos tratados com regeneração óssea guiada e enxertos de origem bovina associados ou não ao laser de baixa intensidade. Estudo histológico e histométrico

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências Odontológicas Aplicadas.

Área de concentração: Reabilitação Oral

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

Versão Corrigida

BAURU
2015

Esper, Luis Augusto
Es69a Avaliação da cicatrização de defeitos ósseos criados
cirurgicamente em calvárias de ratos tratados com regeneração
óssea guiada e enxertos de origem bovina associados ou não
ao laser de baixa intensidade. Estudo histológico e
histométrico./ Luis Augusto Esper. Bauru, 2015.
135 p. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru.
Universidade de São Paulo.

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

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 002/2012
Data: 27/03/2012

DEDICATÓRIA

A Deus,

*Por me conceder a vida e estar comigo em todos os meus passos,
me guiando e protegendo.*

*Aos meus pais, por ter me gerado, educado, e ensinado princípios
que trago comigo. Mesmo nas horas mais difíceis sei que posso
contar com vocês. Muito obrigado por tudo. Em especial, à minha
mãe por sempre demonstrar tanto amor e por seu exemplo de
bondade.*

*Aos meus irmãos, sobrinhos e cunhados por todo apoio, e todo
carinho que sempre demonstraram e pelos momentos agradáveis
que sempre compartilhamos quando estamos reunidos.*

À minha esposa Michyele,

*Tenho você como meu maior tesouro. Impossível traduzir o amor
que sinto por você, e que só aumenta a cada dia. Somos tão
parecidos em tantas coisas, e dividimos alegrias e tristezas
durante toda nossa caminhada juntos. Com você minha vida faz
sentido, e assim nos encontramos a cada dia reafirmando esse
amor que nos acompanha desde aquele momento em que nos
conhecemos. Muito obrigado por estar ao meu lado, minha
companheira de vida e meu grande tesouro. Não conseguiria
chegar até aqui se não tivesse você do meu lado. Amo você.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Bauru- Universidade de São Paulo , nas pessoas de sua Diretora Prof. Dr^a. Maria Aparecida Moreira Machado e Vice-Diretor Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos. Pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração nas pessoas de seu Coordenador Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson. e de todo corpo docente do Departamento de Prótese pela contribuição na minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência em sempre ajudar.

Ao Prof. Dr. Accácio Lins do Valle pelos ensinamentos, pela atenção e forma amigável como sempre me tratou.

Aos professores do Departamento de Prótese: Prof. Dr. Carlos dos Reis Pereira de Araújo, Prof. Dr. Estevam Bonfante, Prof. Gérson Bonfante, Prof. Dr. José Henrique Rubo, Profa. Dra. Karín Hermana Neppelenbroek, Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti, Prof. Dr. Pedro César Garcia de Oliveira, Prof. Dr. Renato de Freitas, Profa. Dra. Simone Soares, Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto, Prof. Dr. Wellington Cardoso Bonachela, pela agradável convivência, e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao prof Dr Jesus Carlos Andreo que possibilitou que realizasse parte da análise dos resultados deste trabalho no Departamento de Anatomia.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luis Scombatti de Souza e Dra. Adriana Maria Mariano Silveira e Souza, por todo conhecimento transmitido, por nos apresentar a Vaní que auxiliou muito em parte do processamento. Pela disposição da Dra Adriana em nos ajudar quando realizamos o processamento laboratorial, e por sempre

nos tratar tão bem. Prof. Sérgio exemplo de profissional , um dos grandes nomes da Periodontia, que admiro muito.

À Profa. Dra. Vanessa Soares Lara, que possibilitou a realização de parte do processamento laboratorial nas instalações do laboratório de Patologia.

À técnica Fátima Aparecida Silveira por auxiliar no processamento laboratorial.

Aos funcionários do Departamento de Prótese: Ana Cláudia Pereira, Cleide Vital Martins, Marcelo Henrique G. De Souza, Reivanildo G. Viana, Valquíria F. Nogueira. Em especial à Deborah Andrea Riêra Blasca pela ajuda de sempre.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação: Maria Margareth Pereira Mokarzel, Ana Letícia Palombo Momesso, Fátima Carvalho Cassador, Eliane Falcão Xavier, Leila Regina da Silva Sanchez pelo auxílio e informações sempre prestados

Às funcionárias da clínica de pós-graduação, Cleusa Gonçalves Leite e Hebe de Freitas Pereira, pela convivência agradável, pelo apoio e ajuda de sempre..

Ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (Centrinho) - Universidade de São Paulo, na pessoa de sua Superintendente Dra. Regina Célia Bortoletto Amantini por contribuir no meu crescimento profissional e pessoal. Pelo exemplo de coragem e força que sempre nos é transmitido pela Superintendente do Centrinho, que realiza de forma primorosa seu trabalho, tão especial e importante aos pacientes.

Ao Prof. Dr. José Alberto de Souza Freitas (Tio Gastão) pelo belo trabalho realizado, humildade e exemplo de amor ao próximo.

A todos os meus colegas do Setor Odontológico do Centrinho pela convivência e amizade: Celso Kenji, Lidiane Castro, Roberta Martinelli, Reinaldo Mazzotini, José Carlos Bastos Jr, Renato Facó, Gabriel Ferreira, Paulo Alceu Trindade, Cláudia Leal, Carlos Alberto Aiello, Rita Lauris, Sílvia Graziadei, Tiago Ribeiro, Arlete Cavassan, Terumi Ozawa, Araci Almeida, Adriano Porto, Rogério Penhavel, Renata S. Zanda, Gleisieli Cardoso, Aparício Dekon, Nádia Svízero, Lillian Matsunaga, Naiara Araújo, Cleide Carrara, Márcia Gomide, Beatriz Costa, Gisele Dalben, Renata Pernambuco, Caio Figueiredo, Flávio Amado, José Fernando Scareli Lopes, Mônica Lopes, Regina Guedes de Azevedo, Rafael Tavano, João Henrique Nogueira, Rosa Ribeiro, Homero Aferrí, Izabel Carvalho, Bruna Centurion, Otávio Pagin e Carlos Alberto.

A todas as auxiliares e funcionários do Centrinho, em especial às auxiliares do setor de Periodontia: Priscila e Cleise.

À Sueli Devides, pela receptividade e convivência sempre harmoniosa e tranquila.

À Elisa Maria pela amizade e forma carinhosa como sempre me tratou.

Aos ex-alunos de Especialização em Periodontia do Centrinho pelo convívio sempre agradável.

À Paula Pessoa, por ser essa pessoa tão querida que muito nos ajudou. Sentimos muito a sua falta.

À Mércia Cunha, por toda ajuda na realização das cirurgias e por todos os momentos agradáveis.

Ao Guilherme Moreira, por todo auxílio na realização dos procedimentos cirúrgicos e pela amizade.

Aos alunos da 5ª turma de Especialização em Periodontia do Centrinho: Camila, Carolina, Felipe, Gustavo, Laís, Luísa, Nicole e Thaís. Obrigado pela amizade.

Aos pacientes do Centrinho, que me ensinam muito sobre a vida. Espero retribuir o carinho que recebo de todos, trabalhando e lutando para sempre melhorar e oferecer a vocês o melhor tratamento.

Ao Sr. Rodney e Sra. Beatriz, pessoas muito especiais que me presentearam com meu maior tesouro. Estou sempre orando para que Deus proteja e guie vocês pela vida.

*Aos meus cunhados Danielle, Teruo, Francielle e Maurício
Pela amizade e apoio, pelos momentos agradáveis e conversas que sempre tivemos.*

Aos meus queridos tios e padrinhos Miriam e Fernando pela companhia sempre agradável, e por todo carinho que sempre demonstraram. Fico muito feliz em ter vocês por perto.

À Universidade Sagrado Coração, na pessoa da reitora Profa. Dra. Irmã Suzana de Jesus Fadel e vice reitora Profa. Dra. Irmã Ilda Basso, obrigado pela acolhida e constante incentivo.

À Diretora do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Sagrado Coração Profa. Dra. Leila Maria Vieira pelo apoio e conversas amigáveis que sempre tivemos. Admiro bastante seu trabalho e dedicação.

Ao Coordenador do curso de Odontologia da Universidade Sagrado Coração Prof. Dr. Fernando Orosco pelo constante apoio, e pela forma como sempre conduziu nossos trabalhos na universidade.

A todos os docentes e funcionários da Universidade Sagrado Coração.

Aos docentes da Periodontia da Universidade Sagrado Coração: Beatriz Maria Valério Lopes, Mirella Lindoso, Élcia Maria Silveira, Michyele Sbrana pelo convívio sempre amigável e respeitoso. Por todos os momentos que compartilhamos. Em especial, à Profa. Patrícia Pinto Saraiva, pela confiança em mim depositada, ajudando sempre em tudo que precisei e pela amizade.

A Profa Bella Luna Ishikiríama pela agradável convivência e amizade.

Ao Prof Leandro Holgado por toda ajuda e pela sua amizade.

À Dra Cláudia de Almeida Prado e Píccino Sgavioli por toda sua paciência, compreensão e pela maneira respeitosa e amigável como sempre me tratou. Por ter me ajudado sempre que precisei. Tenho muito respeito e admiração pela Sra.

À Maira Couto pelo auxílio que sempre tive na parte laboratorial, por sua imensa contribuição e pelo profissionalismo exemplar.

À Vaní Maria Alves, técnica do Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela contribuição no processamento laboratorial.

Aos alunos da Universidade Sagrado Coração, pela oportunidade de ensinar e aprender com vocês.

A todos aqueles que me incentivaram, torceram por mim ou contribuíram na execução deste trabalho, muito obrigado.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À Minha querida orientadora
Profa Dra Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida*

Sinto-me honrado de ter você como minha orientadora e amiga. Um exemplo de pessoa, mulher corajosa, batalhadora, uma guerreira. Profissional competente, uma inspiração para todos seus orientados. Serei eternamente grato por toda sua atenção e carinho, além de todo conhecimento transmitido. Tudo que aprendi na Periodontia foi porque tive você para me ensinar, e principalmente corrigir os erros.

Uma pessoa com tantas virtudes e nobreza de sentimentos, que sempre admirei desde que conheci. Foi Deus colocou você no meu caminho, e eu agradeço todos os dias por isso. Nos momentos de alegria e tristeza estive sempre ao nosso lado. Muito obrigado por me fazer ver a vida de uma forma mais tranquila, porque você com toda sua sabedoria e luz consegue transmitir essa paz para todos que estão ao seu lado.

Seria praticamente impossível expressar em palavras todas as suas qualidades, e a admiração e carinho que tenho por você. Torço muito pelo seu sucesso.

Muito Obrigado por fazer parte da minha vida

RESUMO

O propósito deste estudo foi avaliar histologicamente o papel do laser de baixa intensidade (LB) no processo de cicatrização óssea de defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos tratados com osso bovino (BO) associados a regeneração óssea guiada (ROG). Foram utilizados 80 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), pesando entre 250 e 300 g. Um defeito ósseo de tamanho crítico (DTC) com 5 mm de diâmetro foi criado na calvária de cada animal. Os animais foram divididos aleatoriamente em 8 grupos de tratamento (n=10), sendo: 1) Grupo C (controle), 2) Grupo LB - laser de baixa intensidade (laser de baixa intensidade - GaAlAs, 730nm, 100mW, 6J, 210J/cm²), 3) Grupo BO (osso bovino), 4) Grupo ROG (membrana colágena), 5) Grupo BO/ROG (osso bovino/membrana colágena), 6) Grupo BO/LB (osso bovino/laser de baixa intensidade), 7) Grupo ROG/LB (membrana colágena/laser de baixa intensidade), 8) Grupo BO/ROG/LB (osso bovino/laser de baixa intensidade/membrana colágena). Após 30 dias, os animais foram submetidos à eutanásia. As variáveis avaliadas foram: área de osso neoformado (AON), extensão linear de osso (ELO) e área de partículas remanescentes (APR). Foi utilizado o teste paramétrico ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Todos os grupos apresentaram maiores médias de AON em relação ao grupo C, exceto os grupos BO, BO/ROG e BO/ROG/LB. Todos os grupos apresentaram médias de ELO estatisticamente diferente do grupo C, exceto o BO. O grupo BO/ROG/LB não apresentou maiores médias de AON e ELO que o Grupo BO/ROG, entretanto mostrou maior formação óssea na região da membrana quando utilizado o LB em associação ao BO/ROG na análise histológica. Maior APR foi observada nos grupos em que BO não foi irradiado pelo LB. Entretanto, não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre APR nos grupos BO e BO/ROG, BO/LB e BO/ROG/LB, BO/ROG e BO/ROG/LB. O LB não levou a maior formação óssea histométrica quando associado ao BO/ROG, apesar de promover maior formação óssea na análise histológica na região da membrana.

Palavras Chave: Lasers. Ratos. Regeneração.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate histologically the low level laser (LB) on bone healing in critical-size calvarial defects (CSD) in rats treated with inorganic bovine bone (BO) and guided bone regeneration (GBR). Were used 80 male adult rats (*Rattus norvegicus albinus Wistar*) weighing 250 to 300 g. A bone defect of critical size (DTC) with 5 mm in diameter was created in the calvaria of each animal. The animals were randomly divided into 8 treatment groups (n = 10), 1) Group C (control), 2) Group LB - low level laser (low level laser - GaAlAs, 730nm, 100mW, 6J, 210J / cm²), 3) Group BO (bovine bone), 4) Group ROG (collagen membrane), 5) Group BO / ROG (bovine bone / collagen membrane), 6) Group BO/ LB (bovine bone / low level laser), 7) Group ROG / LB (collagen membrane / low level laser), 8) Group BO / LB / ROG (bovine bone /low level laser / collagen membrane). After 30 days, the animals were euthanized. The variables analyzed were newly formed bone area (AON), linear extension of bone (ELO) and area of remnant particles (APR). The parametric test ANOVA followed by Tukey's test was used. All groups have the highest mean AON compared to C group except the group BO, BO/ROG and BO / ROG / LB. All groups showed mean of ELO statistically different from group C, except the BO. The Group BO/ROG/LB did not show higher ELO and AON than Group BO/ROG, however showed increased bone formation in the membrane area when used LB with BO/ROG in the histological analysis. Higher APR was observed in the groups where BO is not irradiated by LB. However, there was no significant difference between APR in BO BO and BO/ROG groups, BO/LB and BO/ROG/LB groups. The LB has not provide greater histometric bone formation when combined with BO / ROG, despite promote greater bone formation in the histological analysis.

Key Words: Lasers. Rats. Regeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

FIGURA 1	- (a) Após tricotomia, antissepsia da região dorsal do crânio com PVPI.	44
FIGURA 2	- (a) Retalho total descolado na calvária, com exposição do tecido ósseo. (b) Broca trefina em posição, com auxílio de guia cirúrgico. (c) DTC de 5mm.	45
FIGURA 3	- Marcações em “L” confeccionadas anterior e posterior ao DTC, distando 2 mm das bordas do defeito cirúrgico e preenchidas com amálgama.	46
FIGURA 4	- Aplicação do LB nas margens do defeito cirúrgico.	47
FIGURA 5	- Defeito cirúrgico preenchido com BO	47
FIGURA 6	- Defeito cirúrgico tratado com ROG.....	48
FIGURA 7	- Defeito cirúrgico preenchido com BO e irradiado com LB.....	48
FIGURA 8	- Tratamento realizado no Grupo BO/ROG/LB. (A) Defeito preenchido com BO e irradiado LB. (B) Membrana colágena adaptada na região do defeito e estendendo-se 2mm além do defeito original	49
FIGURA 9	- Esquema de Aplicação do LB. Pontos vermelhos representando regiões irradiadas	50
FIGURA 10	- Espécime dividido em duas metades após descalcificação, utilizando as marcações em “L” para identificar o centro do defeito cirúrgico original.....	51
FIGURA 11	- A). Delimitação do defeito cirúrgico criado originalmente e da área total do defeito (AT), assim como AON (área de osso neoformado). (B) Quantificação da área de partículas remanescentes de BO. (C) Medidas lineares de ELO.	53

FIGURA 12 - Fotomicrografia do grupo C. Visão panorâmica do defeito cirúrgico.4x, HE. Extensão de osso neoformado apenas nas extremidades do defeito cirúrgico original. Não ocorre a manutenção da espessura da calvária.....	57
FIGURA 13 - Fotomicrografia do Grupo C. Extremidade do defeito ósseo criado originalmente (setas) com pouca neoformação óssea junto à margem defeito e vários osteócitos.10x, HE.....	59
FIGURA 14 - Fotomicrografia do Grupo LB. Visão panorâmica com osso estendendo-se da extremidade em direção ao centro do defeito cirúrgico. A espessura da calvária não é mantida na região central do defeito. 4x, HE	59
FIGURA 15 - Fotomicrografia do Grupo LB. Osso neoformado na extremidade do DTC (setas), estendendo-se em direção ao centro do defeito, porém não mantendo espessura original da calvária. Fibras colágenas paralelas no limite inferior do osso neoformado.10x, HE.	61
FIGURA 16 - Fotomicrografia do grupo LB. (A) Ausência de infiltrado inflamatório e vários vasos sanguíneos. 20x, HE. (B) Fibras colágenas paralelas, e organizadas. 20x, TM.....	63
FIGURA 17 - Fotomicrografia do Grupo LB, na região central do DTC, com áreas de neoformação óssea e fibras colágenas paralelas e bem inseridas no tecido ósseo (setas). 40x, TM	65
FIGURA 18 - Fotomicrografia do grupo ROG. Formação óssea na região central do defeito cirúrgico. Formação de novo osso foi evidenciada na região acima da delimitação do defeito criado, no interior da membrana. Resquícios da membrana também estão presentes, e não ocorreu restabelecimento completo da espessura da calvária. 4x, HE.....	65
FIGURA 19 - Fotomicrografia do grupo ROG. Região da membrana mineralizada, com formação óssea além dos limites originais da calvária. (A) Formação de tecido ósseo e matriz osteóide estendendo-se em direção ao centro do defeito cirúrgico.10x, TM. (B) Região central da membrana com vários espaços medulares e resquícios da membrana. 20x, TM.....	67

FIGURA 20 - Fotomicrografia do grupo ROG. (A) Área de formação osteóide na região central da membrana, com resquício da membrana (seta) e fibras conjuntivas dispostas paralelas. (B) Área de vasos sanguíneos no interior da membrana (asterisco) e regiões de osso neoformado (quadrado). 40x, TM.....	69
FIGURA 21 - Região central do defeito no grupo ROG/LB com formação óssea além da espessura original da calvária.20x, HE	71
FIGURA 22 - Fotomicrografia do grupo ROG/LB. Fechamento do defeito cirúrgico em extensão, porém sem manutenção da espessura original da calvária. 10x, HE.....	71
FIGURA 23 - Fotomicrografia do grupo ROG/LB. (A) Área de ossificação da membrana na região central do defeito e com resquícios da membrana. 20x, TM. (B) Osso neoformado na extremidade do defeito cirúrgico e na região da membrana, sobre a margem óssea original da calvária. 20x, TM. (C) Osso neoformado com vários espaços medulares sobre o limite ósseo original do defeito. 40x, TM.....	73
FIGURA 24 - Fotomicrografia do grupo ROG/LB. (A) Tecido ósseo neoformado na região central da membrana com vários espaços medulares. 40x, TM. (B) Fibras colágenas bem organizadas na região central do defeito, entre as margens de tecido ósseo neoformado. 40x, TM	75
FIGURA 25 - Fotomicrografia do grupo BO. Manutenção da espessura da calvária, com bastante partículas remanescentes e pouco tecido ósseo neoformado. 4x, HE.	77
FIGURA 26 - Partícula do grupo BO, envolta por tecido conjuntivo com fibras paralelas. Presença de osteoclasto na periferia da partícula. 40x, HE	77
FIGURA 27 - Fotomicrografia do grupo BO/LB . Manutenção da espessura da calvária, com extensão de novo osso em direção ao centro do defeito cirúrgico criado. 4x, HE.....	79
FIGURA 28 - Formação óssea no interior e entre partículas de BO. 40x, HE.	79
FIGURA 29 - Fotomicrografia do grupo BO/LB. (A) Presença de vasos sanguíneos. (A,B) Tecido conjuntivo organizado entre as partículas de BO. 40x, TM.	81

FIGURA 30	- Fotomicrografia do Grupo BO/ROG. A espessura da calvária foi mantida e há formação de novo osso na região da membrana. 4x, HE	83
FIGURA 31	- Fotomicrografia do Grupo BO/ROG. Tecido conjuntivo com fibras colágenas paralelas. 20x, TM.....	83
FIGURA 32	- Fotomicrografia do Grupo BO/ROG/LB. Formação óssea estendendo-se em direção ao centro do defeito cirúrgico, mantendo a espessura da calvária. 4x, HE	85
FIGURA 33	- Fotomicrografia do Grupo BO/ROG/LB. Formação de matriz osteóide no interior da partícula de BO. 40x, HE	85
FIGURA 34	- Fotomicrografia do Grupo BO/ROG/LB. Fibras colágenas bem organizadas ao redor das partículas, e ossificação da membrana. 20x, HE.	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Média, desvio-padrão, Q25, mediana e Q75 dos valores de área de osso neoformado em % (AON).....	87
TABELA 2	- Análise estatística descritiva de ELO (% em relação à AT). Média, desvio-padrão, Q25, mediana, Q75.....	89
TABELA 3	- Comparação múltipla dos valores de AON (%) entre os grupos tratados e o Grupo C	89
TABELA 4	- Comparação múltipla dos valores de ELO (%) entre o Grupo C e os demais.....	90
TABELA 5	- Comparação múltipla dos valores de AON (%) entre o Grupo LB e os demais.	90
TABELA 6	- Comparação múltipla dos valores de ELO (%) entre o Grupo LB e os demais	91
TABELA 7	- Comparação múltipla dos valores de AON (%) entre o Grupo BO e os demais.....	91
TABELA 8	- Comparação múltipla dos valores de ELO (%) entre o Grupo BO e os demais.....	92
TABELA 9	- Comparação múltipla dos valores de AON (%) entre o Grupo ROG e ROG/LB com os demais	92
TABELA 10	- Comparação múltipla dos valores de ELO (%) entre o Grupo ROG e os demais.....	93
TABELA 11	- Comparação múltipla dos valores de AON (%) dos Grupos BO/LB e BO/ROG com os demais	93
TABELA 12	- Comparação múltipla dos valores de ELO (%) dos Grupos BO/LB e BO/ROG com os demais	94
TABELA 13	- Média, desvio-padrão dos valores de APR (%).	94
TABELA 14	-- Comparação múltipla dos valores de APR (%)	94

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Modelo Animal	24
2.2	Regeneração óssea guiada.....	26
2.3	Osso Bovino	30
2.4	Laser de Baixa Intensidade	33
3	PROPOSIÇÃO	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1	Procedimento Cirúrgico	43
4.2	Protocolo de Aplicação do Laser de Baixa Intensidade.....	50
4.3	Processamento tecidual	51
4.4	Análise histomorfométrica	52
4.5	Análise estatística.....	53
5	RESULTADOS.....	55
5.1	Análise Histológica Qualitativa	57
5.2	Análise Histométrica e estatística	87
6	DISCUSSÃO.....	95
7	CONCLUSÃO	103
	REFERÊNCIAS	107
	ANEXO	133

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O osso é considerado o segundo tecido mais transplantado, sendo superado apenas pelo transplante sanguíneo (Boyce et al. 1999; Van Heest and Swintowski, 1999). Mais de 500.000 procedimentos de enxerto ósseo são realizados anualmente nos Estados Unidos e 2.2 milhões no mundo para reparar defeitos ósseos em ortopedia, neurocirurgia e odontologia (Muschler et al., 1996; Lewndrowski et al., 2000; Giannoudis et al., 2005).

Embora muitas fraturas ósseas cicatrizam naturalmente sem complicações, 5 a 10% dos pacientes apresentam problemas na cicatrização como a persistência de defeitos ósseos, cicatrização prejudicada ou ambos (Einhorn 1995). O tratamento destas complicações pós-traumáticas ainda é considerado um antigo desafio (Sauer e Schoettle, 1979). A presença de defeitos ósseos na região maxilofacial, decorrentes de doença inflamatória prévia, trauma, deformidades anatômicas ou congênitas constitui um dos maiores problemas terapêuticos (Mardas et al., 2008) e uma situação desafiadora, particularmente nos casos de grandes deformidades, nas quais a capacidade regenerativa fisiológica do tecido é excedida (Burg et al., 2000).

A reabsorção óssea alveolar também ocorre após a exodontia, sendo que 50% da largura do rebordo alveolar é perdida após 12 meses, e 2/3 desta perda ocorre nos primeiros 3 meses de cicatrização (Schropp et al., 2003), sendo as paredes do alvéolo reduzidas tanto em altura como espessura (Araújo et al., 2005; Araújo et al., 2006), e com alterações dimensionais mais proeminentes na parede óssea vestibular (Pietrokovski & Massler 1967; Pietrokovski et al., 2007). Essas alterações podem interferir negativamente na instalação de implantes osseointegráveis e influenciar no sucesso do tratamento com prótese fixas ou removíveis, e assim comprometer a reabilitação estética e funcional do paciente (Schropp et al., 2003).

Várias são as técnicas e materiais empregados com intuito de regenerar o tecido ósseo nos casos de alvéolos de extração, defeitos horizontais e verticais de rebordo, e também em associação ao levantamento de seio maxilar. Entre os principais procedimentos e técnicas utilizados estão o uso de enxertos particulados, regeneração óssea guiada (membranas), enxertos em bloco, e distração osteogênica, podendo ser utilizadas estas modalidades terapêuticas isoladamente ou combinadas (McAllister & Haghighat, 2007).

A regeneração óssea guiada é uma técnica fundamentada no princípio da utilização de membranas, sendo considerada uma das mais aceitáveis e confiáveis técnicas para ganhar

volume ósseo (Molly et al., 2006). A técnica consiste na utilização de membrana para manter espaço na região do defeito ósseo, promovendo a migração de células osteogênicas e impedindo que células indesejáveis dos tecidos adjacentes ocupem a área do defeito a ser regenerado (McCallister & Haghghat, 2007).

As membranas podem ser associadas ao enxerto ósseo autógeno, alógeno, além de materiais aloplásticos (Ozdemir et al., 2013) com resultados bastante favoráveis, como aumento ósseo horizontal quando utilizadas com osso autógeno em bloco (Buser et al., 1993; Buser et al., 1995; Buser et al., 1996) ou minimizando a reabsorção do enxerto ósseo (Widmark et al. 1997; Chiapasco et al., 1999; Antoun et al., 2001; von Arx et al., 2001, von Arx et al., 2006).

Substitutos ósseos têm sido utilizados cada vez mais na terapia regenerativa (Ozdemir et al., 2013; Hallman & Thor, 2008) já que, o osso autógeno, apesar de ser considerado o “padrão ouro”, apresenta inúmeras desvantagens como a taxa de reabsorção não controlada, disponibilidade limitada e necessidade de segundo sítio cirúrgico (Hallman & Thor, 2008).

O osso bovino é um enxerto xenógeno utilizado como alternativa ao enxerto autógeno (Ezirganli et al., 2013; 2014) por apresentar similaridade estrutural ao osso humano (Hallman & Thor, 2008). Este material já possui bastante documentação de suas propriedades osteocondutivas em vários procedimentos de regeneração óssea (Baldini et al., 2011). Estudos pré-clínicos já comprovaram a biocompatibilidade e integração deste substituto ao osso regenerado (Isaksson, 1992, Berglundh & Lindhe, 1997; Araújo et al., 2008; Araújo et al., 2011). Várias revisões de literatura e estudos clínicos já comprovaram a efetividade deste substituto ósseo nos procedimentos regenerativos (Trombelli et al., 2002; Esposito et al., 2006; Mardas et al., 2010; Badini et al., 2011; Silvestri et al., 2011; Jambhekar et al 2015), associado ou não a membranas em defeitos suportivos (Balini et al., 2011; Jambhekar et al 2015).

As membranas utilizadas para regeneração óssea guiada podem ser absorvíveis ou não absorvíveis. Dentre as membranas não absorvíveis, de politerafluoroetileno expandido (ePTFE) foi bastante pesquisada em humanos (Buser et al., 1993; Buser et al., 1995) e animais (Jovanovic et al., 1995), sendo considerada como padrão ouro (Hardwick et al., 1995). Porém, as membranas não absorvíveis apresentam como desvantagem a necessidade de uma segunda cirurgia para removê-la, podendo neste momento levar a injúria do tecido regenerado, pois quando há descolamento do retalho pode haver reabsorção da crista óssea alveolar (Pihlstrom et al, 2003). Além disso, exposição ao meio oral e consequente contaminação tem sido frequentemente relatados com a utilização dessas membranas (Selvig

et al., 1992) assim como remoção prematura de membrana (Colangelo et al., 1993; Sevor et al., 1993; Zitzmann et al., 1997).

Para solucionar as desvantagens relacionadas ao uso das membranas não absorvíveis, membranas absorvíveis (sintéticas ou constituídas por colágeno) tem sido preconizadas com resultados similares àqueles das membranas de ePTFE (Rothamel et al., 2004). Membranas colágenas tem sido consideradas superiores às membranas não absorvíveis na cicatrização óssea. Elas possuem como benefícios a estabilização do coágulo sanguíneo e hemostasia, possuem capacidade de quimiotaxia para fibroblastos e aumentam a espessura do retalho sobrejacente (Bunyaratavej & Wang 2001).

As membranas absorvíveis colágenas possuem função de barreira por tempo variável, limitado a algumas semanas (Zellin et al., 1995; Owens & Yukna, 2001) . Por outro lado, o osso bovino possui certa resistência a reabsorção (Araújo et al., 2002), podendo levar até anos para ser totalmente reabsorvido (Erziganli et al., 2014), mas as suas partículas são frequentemente envolvidas por novo osso (Lindhe et al., 2014). Tem sido sugerida a utilização combinada do osso bovino ao osso autógeno e membranas colágenas com a finalidade de impedir seu colapso e favorecer o processo de reparação óssea (Maiorana et al., 2011).

Acelerar o processo da reabilitação oral é ainda um objetivo clínico desafiador e importante (Khadra et al. 2004), e a busca por técnicas que beneficiem e acelerem o reparo ósseo diminuindo o tempo do tratamento tem sido amplamente pesquisadas. A utilização do laser de baixa intensidade (LB) é uma das possíveis terapias coadjuvantes neste processo.

O LB possui efeitos biomodulatórios, e existem relatos de que estimula o reparo ósseo (Merli et al., 2005; Pereira et al., 2009) afetando proliferação, diferenciação e adesão celular (Merli et al., 2005).

O LB atua na membrana celular e mitocôndria, aumentando a produção de ATP (adenosina trifosfato), síntese de DNA e RNA, síntese de colágeno e seus precursores além de neovascularização e proliferação celular (Martinez et al., 2008). Efeitos positivos do LB tem sido relatados em estudos in vitro (Dörtbudak et al., 2000; Pinheiro et al., 2003; Stein et al., 2005) e in vivo (Gerbi et al., 2005; Stein et al., 2005; de Almeida et al., 2014; Cunha et al., 2014). Entretanto, outros estudos não demonstraram efeitos positivos do LB na cicatrização do tecido ósseo (Lugar et al., 1998; Anneroth et al., 1998).

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Diferentes biomateriais e técnicas de enxertia tem sido preconizados e descritos na literatura com a finalidade de regenerar os defeitos ósseos (Vajgel et al., 2014), nos casos de alvéolos de extração, aumento horizontal ou vertical de rebordo e levantamento de seio maxilar (McAllister & Haghghat, 2007). O enxerto ósseo autógeno é considerado o “padrão-ouro” para utilização nas cirurgias ósseas reconstrutivas (Valiati et al. 2012; Boyce et al. 199; Ladd & Pliam, 2001) por ser considerado um material que apresenta os princípios básicos para a regeneração óssea que são a osteogênese, osteocondução e osteoindução (Cypher & Grossman, 1996).

Quanto aos princípios biológicos necessários para a regeneração óssea quando utilizados materiais de enxertia e/ou substitutos ósseo, pode ser inferido que osteogênese é a capacidade de preservação de elementos celulares no enxerto e que sintetizam novo osso no sítio receptor. Osteocondução é a capacidade do enxerto ou substituto ósseo de atuar como arcabouço (passivo), para facilitar a migração de vasos sanguíneos e formação de novo osso. Osteoindução é definida como o estímulo e ativação de células mesenquimais indiferenciadas no tecido adjacente ao enxerto, que diferenciam-se em osteoblastos. Este processo é mediado pela presença de fatores de crescimento presentes no enxerto, com destaque para as proteínas morfogenéticas óssea (BMP's) (Greenwald et al., 2000), inicialmente identificadas por Urist (1965) e que até os dias atuais têm sido bastante estudadas por seu papel fundamental na regeneração óssea.

Estudos clínicos demonstram que o enxerto autógeno propicia os melhores resultados na formação óssea pós-enxerto, e isto está fundamentado na sobrevivência das células presentes no osso autógeno durante a realização do enxerto (Khan et al., 2000). Osteócitos que estiverem distantes 1mm ou mais de uma fonte vascular durante este processo cicatricial irão morrer (Schenk et al., 1994) e haverá prejuízo na formação óssea. Um estudo realizado em calvárias de coelhos demonstrou resultados superiores do enxerto ósseo autógeno em relação a outros materiais de enxertia (Mokbel et al., 2008).

Apesar do osso autógeno ser considerado o “padrão ouro” na regeneração óssea (Weingart & Petrin, 1999), algumas desvantagens estão associadas com a sua utilização, como a necessidade de um segundo sítio cirúrgico (que aumenta a morbidade e tempo pós-operatório), a limitada quantidade de osso intra-oral disponível no sítio doador (Sanchez et al., 2003; Valiati et al., 2012) além do tempo de cicatrização, custo mais elevado (Dodson, 1997)

e reabsorção imprevisível (Hjorting-Hansen, 2002; Johansson et al., 2001a; Johansson et al., 2001b; Nkenk et al., 2001; Springer et al. 2004; Hallman & Thor, 2008) o que pode limitar sua utilização. No processo de reconstrução óssea, é bastante importante a participação simultânea de células formadoras de tecido ósseo, além das propriedades de osteocondução e osteoindução (Stavropoulos et al., 2003).

O osso autógeno quando utilizado isoladamente, pode ser rapidamente reabsorvido, podendo comprometer os resultados da terapia regenerativa (Thorwarth et al., 2006). Tem sido sugerido que a adição de um substituto ósseo ao enxerto autógeno poderia resultar em menor reabsorção óssea em longo prazo (Hallman et al., 2002). Clinicamente, a reabsorção de enxerto ósseo autógeno em bloco pode ser reduzida quando combinado com substituto ósseo com reabsorção mais lenta (Maiorana et al., 2005; Adeyemo et al., 2008). Diante do exposto, existe uma incessante busca por enxertos e substitutos ósseos, porém o material perfeito ainda não foi identificado (Hallman & Thor, 2008).

Um substituto ósseo adequado deve ser biocompatível, não desencadear reações imunológicas, ser passível de esterilização, atuar na manutenção e espaço e ser de fácil manipulação. Além disso, deve ser osteocondutor, atuando como suporte biomecânico na estabilização do coágulo sanguíneo nas fases iniciais, e como arcabouço para a formação óssea nas etapas seguintes do processo de cicatrização (Polimeni et al., 2004).

Com intuito de testar materiais e técnicas regenerativas, modelos experimentais pré-clínicos são desejáveis pois propiciam condições fisiológicas e patológicas semelhantes às do humano, podendo assim ser utilizados para estabelecer futuras intervenções clínicas mais efetivas.

2.1 Modelo Animal

A seleção de modelos pré-clínicos frequentemente leva em consideração a escala filogenética, e resultados são considerados fidedignos quando utilizados pequenos animais como roedores para avaliar reparação óssea (Gomes & Fernandes, 2011; Vajgel et al., 2014). Estes animais são considerados preferíveis pela boa relação custo-benefício, facilidade em manuseio e por permitir condições experimentais padronizadas em indivíduos geneticamente similares (Jordan 1971; Pellegrini et al., 2009; Vajgel et al., 2014).

Alguns fatores devem ser considerados previamente à realização de defeitos realizados em calvárias de ratos como a idade dos animais, tamanho e localização dos defeitos cirúrgicos

(Bosch et al., 1996; 1998), além do método de avaliação e período de observação (Bosch et al., 1998; Vajgel et al., 2014).

O defeito de tamanho crítico (DTC) em calvária de rato foi estabelecido como um modelo eficiente para avaliar o potencial de cicatrização e formação de novo osso e de novos biomateriais (Schmitz & Hollinger 1986; Bosch et al. 1998; Mardas et al. 2002; Donos et al. 2004).

Os defeitos de calvária são modelos experimentais mais difíceis de regenerar quando comparados com defeitos de rebordo alveolar (Barboza et al., 2002) e/ou defeitos infra-ósseos ou deiscências (Artzi et al., 2006). Isto ocorre pela ausência de paredes ósseas em todas as extremidades do defeito, e células osteoprogenitoras são provenientes apenas da periferia do defeito cirúrgico (Schenk et al., 1994). Além disso, a localização anatômica e o pobre suprimento sangüíneo na área (Dupoirieux et al., 2001), com pouca medula óssea são características que diferem dos ossos longos, e assim dificulta os eventos da cicatrização (Najjar & Kahn 1977), o que caracteriza o defeito como desejável para testar materiais (Dupoirieux et al., 2001).

Um DTC foi originalmente definido como aquele de menor tamanho intra-ósseo em determinada espécie de animal e osso, que não cicatriza espontaneamente durante toda a vida do animal. (Schmitz & Hollinger, 1986). Em decorrência do limite de tempo pós-operatório utilizado em diversos estudos, uma recente definição de defeitos de tamanho crítico foi sugerida por Gosain et al. (2000) considerando que o defeito de tamanho crítico nas pesquisas em animais é aquele no qual o tamanho do defeito não irá cicatrizar totalmente no período de duração do estudo.

A partir de então muito tem sido discutido, com controvérsias na literatura a respeito de qual tamanho de defeito seria considerado crítico quando realizado em calvária de ratos (Hollinger & Kleinschmidt, 1990; Bosch et al., 1998; Donos et al. 2004; Cooper et al., 2010). As dimensões mais utilizadas de defeitos de calvária são 5 mm ou 8 mm. Os defeitos de 5mm já podem ser considerados como críticos, pois em 22 estudos que realizaram defeitos com esta dimensão, não ocorreu o fechamento completo em nenhum dos defeitos realizados no centro da calvária (Vajgel et al., 2014). A cicatrização de defeitos de calvária de 5mm de diâmetro foi avaliada por Donos et al. (2004), e um defeito residual médio de 3,9 mm foi observado após 4 meses de cicatrização, sugerindo que em períodos mais longos torna-se improvável o fechamento completo dos defeitos.

Uma das vantagens da utilização de defeitos de 5 mm de diâmetro é a possibilidade da confecção de mais de um defeito cirúrgico por animal ao adotar-se um modelo experimental

no qual cada animal pode apresentar defeitos que receberão o tratamento (teste) e também o defeito preenchido com coágulo (controle). Desta forma, minimiza-se o número de animais utilizados no experimento, seguindo o princípio dos 3R's ("*Refinement, Reduction, Replacement*") e reduz o viés ocasionado pela variabilidade entre animais diferentes. Em contrapartida, quando realizado mais de um defeito na calvária, materiais utilizados em um deles pode interagir com o controle (Vajgel et al., 2014) e dessa forma pode estar indicado a utilização de apenas um defeito central na calvária.

Os defeitos únicos envolvendo o centro da calvária geralmente são os de 5 mm ou 8 mm, sendo que defeitos de menor diâmetro apresentam menor risco de injúria ao seio sagital, hemorragia intra-operatória (Bosch et al., 1998). Existem controvérsias na literatura quanto ao fato de utilizar defeito único na calvária envolvendo a sutura sagital, pois o coágulo sanguíneo poderia modificar a cicatrização óssea inicial, aumentando a formação óssea (Bosch et al., 1998). Entretanto, dados de uma recente revisão sistemática realizada por Vajgel et al. (2014) e que avaliou 61 estudos realizados em calvárias de ratos, concluiu que não houve diferença na quantidade de novo osso formado em defeitos de 5 mm centrais ou bilaterais após 30 ou 90 dias.

O período de avaliação do estudo também é um fator importante a ser considerado na escolha do desenho experimental, e existem relatos de que a maior quantidade de neoformação óssea é encontrada em 4 semanas, diminuindo gradativamente até 24 semanas (Honma et al., 2008; Vajgel et al., 2014).

2.2 Regeneração óssea guiada

A técnica de regeneração óssea guiada (ROG) é uma modalidade terapêutica que foi proposta com a finalidade de aumentar o volume ósseo. Esta técnica tem sido bastante utilizada nos casos de alvéolos de extração, em deiscências ósseas ou em mandíbulas que sofreram reabsorção severa antes da instalação de implantes (Dahlin et al., 1998), com resultados superiores quando utilizada na regeneração óssea (Dahlin et al., 1991; Jovanovic et al., 1992; Cordaro et al., 2002).

O conceito de ROG foi descrito inicialmente por Hurley et al. em 1959, quando membranas com propriedades de oclusão celular foram utilizadas para fusões espinhais em cães. Os princípios na utilização da referida técnica estão baseados na regeneração tecidual guiada (regeneração do aparato de inserção periodontal) e consistem na utilização de

membranas para manter espaço na região do defeito, manutenção de um coágulo sanguíneo na região do defeito ósseo e exclusão de células do tecido conjuntivo gengival com a utilização de uma barreira, garantindo assim um espaço no qual células provenientes do tecido ósseo podem migrar e propiciar a neoformação óssea (Dahlin et al., 1988; Lang et al., 1994).

Na década de 60, a reparação de ossos longos e defeitos em maxilares foi avaliada pela técnica de ROG, quando utilizados filtros de acetato de celulose (Millipore®, MP Millipore Corp., Bedford, MA, USA) como membrana. Entretanto, estes estudos pioneiros não levaram à ampla utilização clínica de membranas (Bassett et al., 1961, 1966; Ruedi & Bassett, 1967; Boyne, 1968, 1969; Buser et al., 1995).

A utilização clínica das membranas foi bem documentada na década de 80 na regeneração dos defeitos periodontais (Nyman et al., 1982; Gottlow et al., 1984). Regeneração periodontal foi demonstrada por Gottlow et al. (1984) em sítios com perda de inserção periodontal em macacos quando utilizado filtros Millipore® ou membranas não absorvíveis (Gore tex®, W. L. Gore & Ass. Inc., Flagstaff, Arizona, USA). Nova inserção foi observada nas raízes em que foram utilizadas as membranas, indicando que favoreceu a repopulação da área tratada por células do ligamento periodontal.

No final da década de 80 e início dos anos 90, as membranas começaram a ser mais utilizadas na ROG (Dahlin et al., 1990; Buser et al., 1993; 1995) e podem ser utilizadas em defeitos de alvéolos de extração, aumento horizontal e vertical de rebordo alveolar, correção de defeitos de deiscência e fenestração peri-implantares. Entretanto, exige excelente habilidade cirúrgica e é considerada uma técnica bastante sensível (McAllister et al., 2007).

A utilização de membranas na técnica de ROG promove maior formação óssea em relação a sítios controles em estudos clínicos (Dahlin et al., 1991; Jovanovic et al., 1992; Cordaro et al., 2002) e em animais (Dahlin et al., 1990; Dahlin et al., 1988; Simion et al., 1999; Donos et al., 2004). Porém, para alcançar o sucesso completo, a membrana deve ser seletivamente oclusiva, impedindo a penetração de tecido fibroso, não sofrer colapso, e manter espaço para o coágulo sanguíneo (Lundgren et al., 1992; Bosch et al., 1998), permitindo assim o recrutamento e proliferação de células osteoprogenitoras que irão se diferenciar em linhagens osteoblásticas e expressar atividade osteogênica (Linde et al., 1993; Karring et al., 1993; Retzepi et al., 2010).

Alguns tipos de defeitos ósseos são conhecidos com suportivos como é o caso dos alvéolos de extração nos quais há paredes ósseas intactas em todo o defeito. Nos defeitos conhecidos como não-suportivos, a membrana não é sustentada completamente por paredes

ósseas locais e há susceptibilidade ao colapso parcial da membrana (Buser et al., 1990; Schenk et al., 1994; Buser et al., 1995). Uma das vantagens do defeito de calvária, é não ser totalmente suportivo (Hämmerle et al., 1998; Hämmerle & Lang 2001), uma vez que a proliferação óssea pode ocorrer apenas da superfície óssea das bordas da calvária (Donos et al. 2004). Além disto, esse tipo de defeito possui menor relação entre a profundidade e largura, o que dificulta a migração de células, por não possuir paredes ósseas, e o fechamento ósseo espontâneo. Portanto, as características de forma do defeito de calvária também contribuem para o baixo potencial biológico de regeneração óssea e propriedades mecânicas superiores são exigidas de membranas para impedir o colapso da mesma e prejuízo na cicatrização óssea (Schliephake et al., 2001).

Membranas não absorvíveis de politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE) por muito tempo foram utilizadas na regeneração óssea, e considerada como padrão ouro (Hammerle & Jung 2003; Schielephake et al., 2004; Retzepi & Donos 2010). Quando avaliada a cicatrização de calvária de ratos, a membrana de ePTFE propiciou maior formação e espessura óssea quando comparada ao defeito que não recebeu tratamento (Bosch et al., 1986; Dupoirieux et al., 2001).

A maior desvantagem clínica das membranas ePTFE é a necessidade de um segundo ato cirúrgico para serem removidas (Retzepi & Donos, 2010), além do risco de exposição prematura, que pode levar à contaminação bacteriana (Selvig et al., 1992; Temprow et al., 1993; Simion et al., 1998; Machtei, 2001) e comprometer os resultados da terapia regenerativa (Gher et al., 1994; Nowzari et al., 1995). Para evitar estas desvantagens, as membranas absorvíveis começaram a ser cada vez mais pesquisadas (Retzepi & Donos, 2010).

O colágeno é material desejável para confecção de membranas pois sua degradação é fisiológica, é de fácil manipulação, possui baixa imunogenicidade além de outras características desejáveis, como participação na quimiotaxia e adesão de células osteoprogenitoras (Schlegel et al., 1997; Hämmerle et al., 1998a; Hämmerle et al., 1998b; Bunyaratavej & Wang 2001; Moses et al., 2008). Atualmente, membranas de colágeno têm sido a opção de escolha no tratamento clínico regenerativo (Jung et al. 2012) pois regula o crescimento e diferenciação de osteoblastos (Shi et al., 1996), minimiza a micromovimentação por se integrar ao tecido formado (Sevor et al., 1993), reduz a taxa de infecção, possui propriedades hemostáticas (Stein et al., 1985) além de não necessitar de segunda cirurgia para remoção (Park et al. 2008).

Membranas colágenas apresentam como desvantagem a pobre manutenção de espaço no defeito a ser regenerado (Schliephake et al., 2004) comprometendo a quantidade de osso neoformado (Dahlin et al., 1991b; Kostopoulos & Karring 1994a; Kostopoulos & Karring 1994b). O uso de enxertos e substitutos ósseos tem sido preconizado para manter o espaço sob a membrana e propiciar a formação óssea (Jung et al., 2013), e o osso bovino tem sido bastante utilizado (Hämmerle et al., 1998; Donos et al., 2004), favorecendo o aumento da espessura óssea (Donos et al., 2004). Quando membranas colágenas são utilizadas com substitutos ósseos, tem sido demonstrado ganho ósseo marginal (Hockers et al., 1999; Brunel et al., 2001; Hämmerle & Lang 2001; Houser et al., 2001; Zitzman et al., 2001) enquanto as utilizadas isoladamente apresentaram resultados negativos, não aumentando a quantidade de osso neoformado em estudos clínicos e em animais (Ozmeric et al., 2000; Dupoirieux et al., 2001; Schliephake et al., 2004).

Em um estudo realizado em calvária de ratos no qual a ROG foi associada ou não ao osso bovino e/ou matriz derivada de esmalte (MDE), ocorreu o completo fechamento da calvária após 4 meses em todos os animais dos grupos tratados com ROG, e com completa cicatrização dos defeitos criados. Desta forma, a previsibilidade na cicatrização dos defeitos poderia ser consequência do uso do princípio de ROG (Donos et al., 2004). Em contrapartida, existem relatos de que a ROG (Bio-Gide®) associada a Osso Bovino (Bio-Oss®) em ratos, pode levar a menor formação óssea que o enxerto de osso autógeno ou bovino (Mokbel et al., 2008) ou que a ROG isoladamente (Stavropoulos et al., 2003).

A utilização de materiais de preenchimento ósseo é importante para manutenção do espaço quando associados à membrana de ROG (Jung et al., 2013). Muitos autores reconheceram que a quantidade de tecido formado está diretamente relacionada ao espaço disponível para que a regeneração aconteça (Minabe, 1991; Dahlin et al., 1991a; Dahlin et al., 1991b). Portanto, é importante que o processo de reabsorção do material não seja maior que a neoformação óssea nos estágios iniciais da cicatrização (Rejda et al., 1977; Nery et al., 1978).

Teoricamente, um substituto ósseo ideal deve ser um arcabouço de fase intermediária, ou seja, deve manter sua arquitetura tridimensional, favorecendo a osteocondução e atuando como um guia para estimular a formação óssea antes de ser gradualmente substituído por novo osso (Turri & Dahlin, 2014).

Clinicamente, a membrana de colágeno (Bio-gide®) demonstrou resultados similares em relação à padrão-ouro de ePTFE (Gore®) quando associada ao osso bovino (Bio-Oss®) em um estudo de boca dividida, no qual foram tratados defeitos ósseos em áreas de instalação

de implantes. A formação óssea foi de 92% e 78% nos grupos tratados com a membrana colágena e de ePTFE, respectivamente, sugerindo que esta membrana colágena pode ser uma boa escolha para regeneração óssea (Zitzmann et al., 1997).

Um estudo realizado em calvárias de coelhos, avaliou a regeneração óssea em defeitos tratados apenas com ROG ou Bio-Oss® (BO) e ROG, e demonstrou que ambos os grupos apresentaram aumento ósseo após 3 meses. No grupo tratado com BO e ROG, as partículas de BO remanescentes estavam bem integradas ao tecido ósseo neoformado com maior formação de tecido mineralizado e maior tendência a formação óssea (Beltrán et al., 2014).

2.3 Osso Bovino

Acredita-se que o método mais apropriado para obter aumento ósseo consiste na utilização de biomaterial associado a membrana, pois além do potencial biológico dos materiais, a manutenção mecânica do material auxilia no processo de cicatrização óssea (Lysiak-Drwal et al., 2008). Membranas absorvíveis necessitam geralmente ser associadas a materiais de preenchimento como enxerto autógeno, ou outros materiais atuando como arcabouço, e o osso bovino aparenta ser o material mais desejável (Chiapasco & Zaniboni, 2009).

O enxerto de osso bovino inorgânico tem sido utilizado com sucesso no tratamento de áreas edêntulas localizadas e na reconstrução óssea em seios maxilares (Fugazzotto, 2003 a; Fugazzotto, 2003 b; Wallace et al., 2005), com relatos histológicos de contato direto entre o material de enxerto e o novo osso mineralizado formado (Wetzel et al., 1995; Berglundh & Lindhe, 1997; Araújo et al., 2001; Camelo et al., 2001; Fugazzotto, 2003 a; Fugazzotto, 2003 b; Wallace et al., 2005; Cardaropoli et al., 2005).

Sua estrutura física assemelha-se à do osso esponjoso humano, constituindo um esqueleto sólido para a migração de células e elementos vasculares que eventualmente facilita a cicatrização óssea, por favorecer a osteocondução. (Rosen et al., 2002). Alguns autores relatam ainda que a estrutura do grânulo de BO e sua composição química são idênticas às do osso natural.

A textura do BO permite a rápida estabilização do coágulo sanguíneo e revascularização, favorecendo a migração osteoblástica e formação óssea nos defeitos ósseos tratados com este material, que é considerado superior em relação à biocompatibilidade e

osteocondutividade (Jensen et al., 1996) quando comparado com outros substitutos ósseos (Hämmerle et al., 1998; Stavropoulos et al., 2003; Iezzi et al., 2008; Ghahroudi et al., 2014).

As propriedades osteocondutoras do osso bovino já foram comprovadas em estudos realizados em diferentes modelos experimentais em animais (Berglundh et al., 1997; Pripatnanont et al., 2007) e em humanos (Traini et al., 2007). Este material atua frequentemente como arcabouço para migração de células osteoprogenitoras oriundas do leito adjacente, capilares e tecido perivascular além de ser uma excelente fonte de cálcio (Richardsson et al., 1999), importante no processo de cicatrização óssea (Mokbel et al., 2008). É atualmente o material mais pesquisado em associação com a técnica de ROG (Retzepi & Donos, 2010; Baldini et al., 2011).

Muito tem sido discutido a respeito da reabsorção ou não das partículas de BO, o que poderia interferir nos resultados clínicos da regeneração. Existem relatos de que a reabsorção osteoclástica provavelmente não ocorre (Schlickewei et al., 1993; Diès et al., 1996) pelo fato do material ser livre de proteínas (Benke et al., 2001; Wenz et al., 2001), ou que a reabsorção é atrasada (Pinholt et al., 1991; Klinge et al., 1992; Wetzel et al., 1995; Hämmerle et al., 1998).

Lindhe & Berglundh (1997) demonstraram que o BO ao sofrer reabsorção pode ser substituído completamente por novo osso em longo prazo. Estudos recentes tem demonstrado que as partículas desse substituto ósseo não são totalmente reabsorvidas, mesmo em longos períodos de tempo (Lindhe et al., 2014). Apesar disso, o osso bovino tem sido amplamente utilizado com resultados efetivos na formação óssea (Valentini et al., 2000; Ferreira et al., 2009; Tetsch et al., 2010; Nevins et al., 2011).

Tapety et al. (2004) avaliaram a atividade celular durante a cicatrização óssea inicial em um estudo histológico em defeitos criados em fêmur de ratos e tratados com enxerto ósseo bovino. Em períodos de 7 e 14 dias de cicatrização, osteoclastos estavam presentes na superfície do osso bovino, sugerindo a possibilidade de remodelação óssea, e foi também observado novo osso na superfície do BO, com intensa imunomarcagem para osteocalcina na camada mais superficial das partículas, aos 5 dias de cicatrização. Os autores concluíram que o BO representa uma excelente escolha na terapia óssea reconstrutiva, por promover atividades osteoblásticas nos períodos iniciais da regeneração óssea.

Quando o osso bovino foi utilizado isoladamente em calvárias de ratos, maior neoformação óssea foi observada em relação aos controles com 8 e 16 semanas (Su-Gwan et al., 2001). Também, em defeitos de tamanho crítico em calvárias de porcos, quando associado 25% de osso autógeno ao osso bovino, uma maior neoformação óssea foi conseguida após 6 e 8 semanas (Thorwarth et al., 2006).

Em defeitos realizados em mandíbulas de porcos tratados com BO, Fosfato de β Tricálcio ou osso autógeno, associados a membranas de e-PTFE. Após 8 semanas o grupo tratado com enxerto bovino demonstrou menor formação óssea (41,6%) em relação ao osso autógeno (54,5%) e Fosfato de β Tricálcio (57,4%), porém com maior fração de tecido mineralizado no grupo do osso bovino (Jensen et al., 2006).

A Associação de BO à ROG (e-PTFE), ou apenas ROG para tratamento de defeitos de deiscências cirurgicamente criados ao redor de implantes em macacos, foram avaliados por Hämmerle et al. (1998). Maior formação óssea em altura foi observada nos grupos que utilizaram a associação do BO com a ROG. Os autores concluíram que o BO pode ser recomendado em associação à ROG para se obter aumento ósseo horizontal e vertical em defeitos de deiscência. Uma revisão sistemática concluiu que em defeitos de deiscência e fenestração óssea, as modalidades terapêuticas melhores documentadas são o osso bovino associado a ROG, enxerto ósseo autógeno particulado associado ou não a membranas absorvíveis, e membrana não reabsorvível isoladamente (Jensen & Terheyden, 2009).

Um estudo realizado em mandíbula de ratos associando BO ou vidro bioativo (Biogran®) à ROG (cápsulas de teflon), demonstrou que ambos os materiais prejudicaram a formação óssea, após 1 ano. No grupo tratado apenas com ROG a formação óssea foi de 88%, frente aos 23,1% e 12,6% nos grupos tratados com BO e Biogran®, respectivamente (Stavropoulos et al., 2003). Os autores concluem que o uso destes materiais em conjunto com membranas oclusivas que possuem risco de colapso deve ser avaliado clinicamente (Stavropoulos et al., 2003).

Resultados promissores já foram relatados com a utilização do enxerto de osso bovino em estudos clínicos (Artzi et al., 2001) e em animais (Torres et al., 2008). Apesar disso, a falta de propriedades osteoindutivas deste material tem despertado interesse em pesquisadores para melhorar seu comportamento “in vivo”. Recentemente o uso de fatores de crescimento para estimular a regeneração óssea associado ao osso bovino tem sido considerado uma alternativa interessante. (Cho, 1995; Lynch et al., 1991a; Lynch et al., 1991b; Giannobile et al., 1996; Wikesjö et al., 1998; Hong et al., 2000; Tresguerres et al., 2002). Entretanto, o alto custo destes materiais tem sido uma das limitações para sua utilização (Findkcioglu et al., 2009).

Diferentes procedimentos e modalidades terapêuticas não invasivas tem sido desenvolvidas com intuito de acelerar a cicatrização de defeitos ósseos (Ghahroudi et al., 2014). Muitos estudos avaliam o potencial de drogas, métodos de fixação e diferentes técnicas

cirúrgicas, e também o laser de baixa intensidade pois existe um potencial destas modalidades adjuntas atuarem no processo cicatricial do tecido ósseo (Tajali et al., 2010; Pinheiro, 2003; Stein, 2005; Saygun et al 2008).

2.4 Laser de Baixa Intensidade

O laser de baixa intensidade (LB) é considerado um método de tratamento promissor (Hamajima et al., 2003; Fernandes et al., 2013), e tem sido utilizado com resultados favoráveis, aumentando as atividades das células ósseas e tornando-se uma possível alternativa em conjunto com materiais de enxertia (Ghahroudi et al., 2014).

O princípio da utilização do laser nos tecidos biológicos está fundamentado na teoria fotoquímica, que explica a sensibilidade das células à luz eletromagnética. Assim, o laser é absorvido por fotorreceptores celulares e uma série de alterações ocorrem no interior da célula, como aumento na sinalização celular e excitação de componentes da cadeia respiratória (Kitchen & Partridge, 1991; Karu et al., 2001), aumentando a produção de Adenosina Trifosfato (ATP) nas mitocôndrias, com o consequente aumento no metabolismo celular (Karu, 1998; Fernandes, 2013).

O LB promove efeitos bioenergéticos, bioelétricos, bioquímicos e bioestimulatórios nas células (Benedicenti, 1982; Passarela et al., 1984; Yaakobi et al., 1996; Silva, 2006). A utilização da terapia com LB cria inúmeras condições ambientais que parecem acelerar a cicatrização de defeitos ósseos “in vivo” e “in vitro” (Pinheiro & Gerbi, 2006). Os efeitos relacionados a esta terapêutica incluem a estimulação do fluxo sanguíneo, recrutamento e ativação de osteoblastos, osteossíntese e diminuição na atividade osteoclástica e ação anti-inflamatória (Nicolau et al., 2003).

Shakouri et al. em 2010 observaram que quando utilizado o LB com comprimento de onda no espectro do infra-vermelho na cicatrização de fraturas em tíbias de coelhos, o LB acelerou o processo de formação do calo ósseo após 2, 5 e 8 semanas de cicatrização, porém o osso apresentou menor resistência biomecânica em relação ao grupo não irradiado. Um estudo em tíbias de coelhos demonstrou que a utilização do LB aumenta o contato osso-implante após 3 e 6 semanas (Pereira et al., 2009).

Estudos “in vitro” e histomorfométricos relatam aumento na capacidade de cicatrização óssea de defeitos padronizados, e melhor cicatrização das fraturas ósseas irradiadas com laser de baixa intensidade (Trelles et al., 1987; Barushka et al., 1995; Yakoobi

et al., 1996; Ozawa et al., 1998; Dortbudak et al., 2000). Uma meta-análise concluiu que sua utilização pode aumentar as propriedades biomecânicas e aumentar a resistência do tecido ósseo em modelos animais (Tajali et al., 2010). Por outro lado, outros não encontraram qualquer efeito do LB no reparo de tecidos moles ou mineralizados (Anneroth et al., 1988; David et al., 1996; Luger et al., 1998).

Diferentes dosimetrias, comprimentos de onda e protocolos de utilização do LB tem sido utilizados na cicatrização óssea (Gross & Jelkmann, 1990; Basford, 1995; Walsh, 1997; Sattayut et al., 1999). A efetividade da combinação de diferentes materiais de enxertia e/ou substitutos ósseos e protocolos de uso do laser não está bem documentada (Ghahroudi et al., 2014).

Um estudo realizado em calvária de coelhos demonstrou que o LB acelerou o processo de remodelação óssea de enxertos ósseos alógenos e maior deposição de colágeno após 35 e 70 dias quando comparado aos grupos que receberam apenas o enxerto alógeno. No estudo em questão não foi utilizada ROG (Valiati et al., 2012).

Não foram encontrados estudos avaliando o papel do LB na cicatrização de BO em ratos (Cunha et al., 2014) e coelhos (Ghahroudi et al., 2014). Entretanto, até o presente momento, nenhum estudo avaliou o real papel do LB associado ao BO e ROG.

Em estudos que associaram materiais de enxerto ósseo mineralizado e LB, ocorreu maior formação óssea no defeito cirúrgico quando comparado ao material de enxerto isoladamente (Pinheiro et al., 2006; Gerbi et al., 2005). A associação de enxerto ósseo, LB e ROG levou ao aumento das concentrações de hidroxiapatita de cálcio (HAC), o principal substrato da estrutura óssea. O aumento do componente HAC pode aumentar a maturação óssea, como sugerido por alguns estudos (Pinheiro & Gerbi 2006; Gerbi et al., 2005; Lopes et al., 2005). Quando avaliado o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio em tíbias de coelhos irradiadas ou não LB (a cada 48 h em 7 sessões de 21,5 J/cm² e potência de 10 mW) foram demonstradas diferenças na concentração de HAC entre os grupos controle e irradiado após 30 e 45 dias. O LB melhorou a cicatrização óssea (Lopes et al., 2005).

Em um estudo histológico e com análise histoquímica, o LB foi utilizado em defeitos ósseos criados em calvárias de ratos. Foram realizadas aplicações diárias durante 6 dias, utilizando 3J por sessão. Na análise histológica, maior quantidade de vasos sanguíneos, fibroblastos e osso foi evidenciada no grupo irradiado em relação aos animais do grupo “sham”, no qual foram apenas simuladas as irradiações. O LB estimulou a deposição de Cálcio, Fósforo e proteínas insolúveis após 14 e 28 dias. Os autores sugerem que isto é indicativo de que o LB acelerou o processo de maturação óssea (Khadra et al., 2004).

O LB tem demonstrado a capacidade de acelerar o processo de cicatrização de fraturas em coelhos e ratos, com aumento da formação de calo ósseo e também da densidade mineral (Matsumoto et al. 2009). A aplicação do LB associada ao Biossilicato demonstrou maior formação óssea e com melhores propriedades biomecânicas em teste que avaliou a consolidação de fraturas ósseas, no pós-operatório de 14 dias (Fangel et al. 2011).

Um recente estudo realizado em calvária de coelhos demonstrou que o LB propiciou maior formação óssea quando associado ao BO e comparado às terapias isoladas no pós-operatório de 4 semanas. Não foram observadas diferenças entre 4 e 8 semanas de cicatrização. (Gharoudi et al., 2014)

É também incerto se a biomodulação resultante da ação do LB na formação óssea é decorrente de efeitos em células mesenquimais ou uma estimulação direta de osteoblastos. É possível que resultados favoráveis na regeneração óssea em espécimes irradiadas sejam decorrentes da liberação de fatores de crescimento, principalmente fatores de crescimento fibroblásticos que atuam em células indiferenciadas aumentando a proliferação celular e secreção de componentes da matriz (Sigurdsson et al., 1995).

Saygun et al (2008) demonstraram que o LB aumenta a produção de fatores de crescimento fibroblástico (FGF) de fibroblastos gengivais humanos. De acordo com Stein et al. (2005), o LB promove proliferação e diferenciação de osteoblastos “in vitro”.

Um estudo que avaliou a cicatrização óssea em defeitos produzidos em fêmur de ratos demonstrou que o LB resultou num efeito de biomodulação positiva sobre o reparo do defeito ósseo submetido a implante de osso bovino inorgânico (Pinheiro et al., 2003). Entretanto, outros trabalhos não encontraram qualquer efeito do LB no reparo de tecidos moles ou mineralizados (Lugar et al., 1998; Anneroth et al. 1998).

Estudos “in vitro” e “in vivo” demonstraram que muitos genes relacionados à formação óssea têm sua transcrição modificada após a realização da terapia com LB (Khadra, 2004; Saracino, 2009; Fávaro-Pipi et al., 2011).

Efeitos positivos foram demonstrados nos períodos iniciais da cicatrização óssea quando o LB foi utilizado com fluência de $100\text{J}/\text{cm}^2$, 2,8J por ponto, potência de 30 mW em defeitos criados em tíbias de ratos, e avaliada a expressão de genes relacionados à proliferação e diferenciação óssea. Análises histológica e de expressão gênica (ALP, Runx-2, OC, RPS-18) foram realizadas após 12h, 36h, 3dias e 5 dias, sendo que em cada tempo as aplicações foram realizadas com intervalo de 24h após a criação do defeito. Nos animais tratados com LB foi observado que após 3 e 5 dias ocorreu melhor organização do tecido de granulação e neoformação óssea, sendo maior no grupo de 5 dias. Aos 3 dias, ocorreu maior

expressão dos genes Runx-2, ALP e OC nos animais tratados com LB em relação aos controles (Fernandes et al., 2013).

Apesar do crescente sucesso da utilização do LB na reparação óssea, poucos trabalhos têm avaliado a associação do LB com biomateriais (Pinheiro & Gerbi, 2006). A comparação de resultados se torna difícil, uma vez que modelos experimentais e duração dos tratamentos são muito distintas (Obradovic et al., 2009).

Pinheiro et al., 2003 avaliaram o efeito do LB quando associado ao osso bovino e membrana para ROG. A aplicação do LB foi realizada a cada 48h até o período de 15 dias. Os autores concluíram que o LB associado ao osso bovino, com ou sem membrana tem feito positivo no reparo do defeito ósseo. Cunha et al. (2014) demonstraram que o uso do LB em defeitos preenchidos com BO promoveu maior formação óssea em relação aos grupo preenchidos com coágulo e BO, isoladamente.

Tem sido postulado que o LB estimula a produção de fatores de crescimento e citocinas que estimulam o sistema circulatório e atuam de forma positiva na cicatrização. Desta forma, o LB pode ter efeitos sistêmicos e estudos que utilizam controles internos (mesmo animal ou paciente como controle e tratamento) podem não demonstrar efeitos benéficos na regeneração óssea (Khadra et al., 2004).

São escassos estudos na literatura que avaliaram o comportamento dos materiais de enxerto ósseo bovino e ROG quando irradiados pelo LB. Com isso, torna-se interessante avaliar esta associação do BO à ROG, irradiados com LB, bem como o papel de cada modalidade terapêutica isoladamente na regeneração óssea.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O propósito deste estudo foi avaliar histologicamente o papel do Laser de Baixa Intensidade (LB) no processo de cicatrização óssea em defeitos de tamanho crítico criados cirurgicamente em calvárias de ratos e tratados com Bio-Oss (BO) associado a regeneração óssea guiada (ROG).

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (CEEPA-Proc N° 002/2012).

Foram utilizados 80 ratos adultos, (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), pesando entre 250 e 300 g (Universidade de São Paulo – USP, do Biotério Central da Faculdade de Odontologia do Campus de Bauru-SP). Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de 12 horas de luz por dia e temperatura entre 22 e 24° C, consumiram ração sólida selecionada e água *ad libitum*. Os animais foram divididos igualmente e aleatoriamente em 8 grupos experimentais: **1) Grupo C** (controle), **2) Grupo LB** (laser de baixa intensidade – TheraLase DMC®, São Carlos, São Paulo, Brasil), **3) Grupo BO** (osso bovino, Bio-Oss®, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça), **4) Grupo ROG** (membrana colágena, Bio-Guide®, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça), **5) Grupo BO/ROG** (Bio-Oss® + Bio-Guide®), **6) Grupo BO/LB** (osso bovino, Bio-Oss®, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça + Laser de Baixa Intensidade - GaAlAs, 730nm, 100mW, 6J, 210J/cm²), **7) Grupo ROG/LB** (membrana colágena, Bio-Guide®, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça + Laser de Baixa Intensidade - GaAlAs, 730nm, 100mW, 6J, 210J/cm²), **8) Grupo BO/ROG/LB** (Bio-Oss® + laser de baixa intensidade + Bio-Guide®).

O operador e um integrante da equipe responsável pela aplicação do LB no momento da realização do defeito cirúrgico desconheciam o tratamento a ser realizado, que foi sorteado após a confecção do defeito cirúrgico. O tratamento foi definido por outro membro da equipe durante a aleatorização (sorteio).

4.1 Procedimento Cirúrgico

Para realização de todos os procedimentos experimentais, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (Vetbrands, Paulinia, Brasil) (0,02 ml/kg) e cloridrato de quetamina (Vetbrands, Paulinia, Brasil) (0,4 ml/kg). Então, foi realizado antissepsia com PVPI na região dorsal do crânio de cada animal (Figura 1).

Figura 1. (a) Após tricotomia, antissepsia da região dorsal do crânio com PVPI.

Uma incisão semi-lunar foi realizada para permitir acesso ao tecido ósseo, e retalho total foi deslocado (Figura 2a). Com uma broca trefina foi realizado um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5mm de diâmetro (Figuras 2b e 2c), sob irrigação abundante com solução salina fisiológica estéril (0,9%). Durante a realização do DTC a dura-mater foi preservada durante a remoção do tecido ósseo (osso parietal), preservando e mantendo a integridade encefálica.

Figura 2 – (a) Retalho total descolado na calvária, com exposição do tecido ósseo. (b) Broca trefina em posição, com auxílio de guia cirúrgico. (c) DTC de 5mm.

Uma marcação em forma de “L” foi realizada 2 mm anterior e outra 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico com broca diamantada nº 3069 (Microdont Micro Usinagem de Precisão Ltda., São Paulo, Brasil), sob irrigação contínua com solução salina estéril e com auxílio de um guia pré-cirúrgico confeccionado em resina acrílica (Jet®, Campo Limpo Paulista, São Paulo, Brasil) após realização do defeito em animal utilizado no estudo piloto. Foram realizadas pequenas cavidades na região das marcações, e as mesmas preenchidas com amálgama (gs80®, sdi, Santry Dublin, Ireland) (Figura 3). As marcações foram realizadas para auxiliar durante o processamento histológico e histométrico, a identificação do centro do defeito cirúrgico, e localização das margens ósseas pré-cirúrgicas.

Figura 3- Marcações em “L” confeccionadas anterior e posterior ao DTC, distando 2 mm das bordas do defeito cirúrgico e preenchidas com amálgama.

No Grupo C, os defeitos cirúrgicos foram preenchidos apenas com coágulo sanguíneo. No Grupo LB, preenchidos com coágulo sanguíneo e aplicado o laser de baixa intensidade (TheraLase DMC®) (Figura 4).

Figura 4 – Aplicação do LB nas margens do defeito cirúrgico.

No Grupo BO foi utilizado Bio-Oss[®] para preenchimento dos defeitos (Figura 5). No Grupo ROG foi utilizada Bio-Guide[®] (Figura 6)

Figura 5- Defeito cirúrgico preenchido com BO.

Figura 6 – Defeito cirúrgico tratado com ROG.

No Grupo BO/ROG, a área do defeito criado foi preenchida com Bio-Oss® e utilizada Bio-Guide®. No Grupo BO/LB os defeitos foram preenchidos com Bio-Oss® e aplicado o laser de baixa intensidade (TheraLase DMC®) (Figura 7).

Figura 7 – DTC preenchido com BO e irradiado com LB.

No Grupo ROG/LB, os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo, aplicado o laser de baixa intensidade (TheraLase DMC[®]) e utilizada Bio-Guide[®].

O tratamento dos defeitos no grupo BO/ROG/LB foi o preenchimento com Bio-Oss[®], aplicação do laser de baixa intensidade (TheraLase DMC[®]) e utilização da Bio-Guide[®] (Figuras 8a, 8b).

Figura 8 - Tratamento realizado no Grupo BO/ROG/LB. (A) Defeito preenchido com BO e irradiado LB. (B) Membrana colágena adaptada na região do defeito e estendendo-se 2mm além do defeito original.

O retalho foi reposicionado e suturado. Cada animal recebeu uma injeção intramuscular de 24.000 unidades de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

4.2 Protocolo de Aplicação do Laser de Baixa Intensidade

O laser utilizado foi o TheraLase DMC®, com meio ativo GaAlAs, no espectro do infra-vermelho, com comprimento de onda (λ) de 780 nm, e tempo de 40 segundos por ponto. A fluência utilizada foi de $210\text{J}/\text{cm}^2$, sendo utilizado 6J por ponto em aplicação única (Figura 10), logo após a confecção do defeito cirúrgico nos grupos que não receberam materiais de enxertia, e nos animais tratados com enxerto, foi realizada imediatamente após a colocação do material.

Foram realizados 4 pontos na superfície do defeito cirúrgico criado e um ponto central (Fig. 9). A aplicação do laser foi realizada no grupo LB após o preenchimento com coágulo sanguíneo, e nos grupos que utilizaram enxerto ósseo bovino (BO), o laser foi utilizado após preenchimento do defeito com o material. Nos grupos com ROG a aplicação foi realizada antes da colocação da membrana no sítio cirúrgico. Cada ponto recebeu uma quantidade de energia de 6J, totalizando 30J de energia entregue ao sistema. As aplicações foram realizadas seguindo um protocolo padronizado, e os pontos de aplicação, seguindo as posições “do relógio” (12h, 3h, 6h, 9h) além do ponto central

Figura 9 – Esquema de Aplicação do LB. Pontos vermelhos representando regiões irradiadas.

4.3 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, e os espécimes descalcificados em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 4% (Dinâmica® Química Contemporânea Ltda., Diadema, Brasil). Após descalcificação, os espécimes foram divididos em duas metades seguindo a referência utilizada anteriormente das marcações em “L” de amálgama (Figura 10).

Figura 10- Espécime dividido em duas metades após descalcificação, utilizando as marcações em “L” para identificar o centro do defeito cirúrgico original .

As peças foram incluídas em parafina e posteriormente realizados cortes seriados longitudinais com 6 µm de espessura a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM), e avaliados os três primeiros cortes para as análises histométrica e histológica em microscopia de luz.

4.4 Análise histomorfométrica

As análises histológica e histométrica foram realizadas por apenas um examinador, previamente calibrado e cego aos grupos experimentais. A calibração foi realizada previamente, com análises repetidas da mesma lâmina em três tempos diferentes, com intervalo de uma semana. O examinador foi considerado calibrado quando as diferentes avaliações das medidas de área e linear não excederam o intervalo de confiança de 95% do erro entre as avaliações. (coeficiente de reprodutibilidade para dados quantitativos)

As imagens dos cortes histológicos foram capturadas com máquina 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. Três imagens foram unidas para compor a imagem da calvária do animal, tomando como ponto de referência estruturas anatômicas em cada corte histológico. A análise histométrica foi realizada com o auxílio do “software” ImageLab 2000 (Dracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil).

Foram selecionados para as análises histológica e histométrica, três cortes histológicos, representando a área central do defeito cirúrgico original. Medidas linear e de área de formação óssea foram realizadas.

Após delimitação da área (em mm²) do defeito originalmente criado, correspondendo à Área Total (AT), a área de osso neoformado (AON) no interior de AT foi determinada, e calculada como uma porcentagem (Figura 11 A). Nos grupos em que foi utilizado material de enxerto, área de partículas remanescentes (APR) também foi mensurada como porcentagem de AT. (Almeida et al., 2014; Melo et al., 2005; Messoria et al., 2008; Garcia, 2013) (Figura 11 B).

Medidas de extensão linear do defeito cirúrgico criado (ELD), tendo como limites as extremidades delimitadas para a medida de AT, e medidas de extensão de novo osso formado (ELO) foram realizadas e expressas em mm (Figura 11 C).

Figura 11- (A). Delimitação do defeito cirúrgico criado originalmente e da área total do defeito (AT), assim como AON (área de osso neoformado). (B) Quantificação da área de partículas remanescentes de BO. (C) Medidas lineares de ELO (HE, 2x).

A relação ELO/ELD foi calculada, e expressa como uma porcentagem de novo osso formado, considerando ELD como a extensão do defeito originalmente criado.

4.5 Análise estatística

A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram analisadas e os mesmos submetidos ao teste de normalidade. Após isto constatou-se que os dados de AON, ENO e APR seguiram a distribuição normal. Foi utilizado o teste paramétrico ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para verificar as diferenças entre os grupos. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 Resultados

5 RESULTADOS

Durante o processamento laboratorial foram perdidos 1 espécime dos grupos C e BO/ROG, 2 do grupo ROG e 3 dos grupos LB e ROG/LB.

5.1 Análise Histológica Qualitativa

Não foi observado em nenhum dos grupos infiltrado inflamatório acentuado. Ocorreu neoformação óssea em extensão variável em direção ao centro do defeito nos diferentes grupos tratados. Fechamento completo do defeito não foi observado, e a espessura original da calvária não foi restabelecida em nenhum dos espécimes (Figura 12).

No Grupo C foi observado tecido conjuntivo frouxo, com fibras colágenas paralelas preenchendo o defeito cirúrgico criado, além de pouca formação óssea e de matriz osteóide em área e extensão, nas extremidades do defeito (Figura 13).

Figura 12. Fotomicrografia do grupo C. Visão panorâmica do defeito cirúrgico. 4x, HE. Extensão de osso neoformado apenas nas extremidades do defeito cirúrgico original. Não ocorre a manutenção da espessura da calvária.

Figura 13 - Fotomicrografia do Grupo C. Extremidade do defeito ósseo criado originalmente (setas) com pouca neoformação óssea junto à margem defeito e vários osteócitos. 10x, HE.

Foi observado no Grupo LB osso neoformado em maior quantidade se estendendo em direção ao centro do defeito cirúrgico (Figura 14 e 15), e a presença de tecido conjuntivo com fibras colágenas paralelas (Figura 16A, 16B). Em um espécime do Grupo LB ocorreu fechamento completo em extensão do defeito, porém não foi restabelecida a espessura original da calvária.

Figura 14 – Fotomicrografia do Grupo LB. Visão panorâmica com osso estendendo-se da extremidade em direção ao centro do defeito cirúrgico. A espessura da calvária não é restabelecida na região central do defeito. 4x, HE.

Figura 15 – Fotomicrografia do Grupo LB. Osso neoformado na extremidade do DTC (setas), estendendo-se em direção ao centro do defeito, porém não mantendo espessura original da calvária. Fibras colágenas paralelas no limite inferior do osso neoformado. 10x, HE.

Figura 16- Fotomicrografia do grupo LB. (A) Ausência de infiltrado inflamatório e vários vasos sanguíneos, 20x HE; (B) Fibras colágenas paralelas, e organizadas. 20x, TM.

Osso neoformado foi observado na região central do defeito cirúrgico em um dos espécimes do Grupo LB, com a presença de fibras colágenas bem inseridas (Figura 17)

Figura 17 - Fotomicrografia do Grupo LB, na região central do DTC, com áreas de neoformação óssea e fibras colágenas paralelas e bem inseridas no tecido ósseo (setas). 40x, TM.

No grupo em que foi utilizada membrana isoladamente (Grupo ROG), ocorreu formação de tecido ósseo em direção ao centro do defeito (Figura 18), com fechamento completo em extensão em um dos espécimes.

Figura 18 – Fotomicrografia do grupo ROG. Formação óssea na região central do defeito cirúrgico. Formação de novo osso foi evidenciada na região acima da delimitação do defeito criado, no interior da membrana. Resquícios da membrana também estão presentes, e não ocorreu restabelecimento completo da espessura da calvária. 4x. HE.

O tecido conjuntivo no grupo ROG, apresentou fibras colágenas paralelas e organizadas. Áreas de mineralização da membrana foram observadas em extensões variáveis, com formação de tecido osteóide (Figura 19A). Em um dos espécimes ocorreu a manutenção da espessura da calvária. Algumas áreas apresentaram formação óssea além dos limites da calvária original em espessura e na região da membrana sobre o tecido ósseo original (Figura, 19B).

Figura 19 – Fotomicrografia do grupo ROG. Região da membrana mineralizada, com formação óssea além dos limites originais da calvária. (A) Formação de tecido ósseo e matriz osteóide estendendo-se em direção ao centro do defeito cirúrgico, 10x. T.M.. (B) Região central da membrana com vários espaços medulares e resquícios da membrana, 40x. T.M.

Resquícios da membrana também foram observados em área de tecido mineralizado (Figuras 20A, 20B). Em um dos espécimes não havia formação óssea.

Figura 20 – Fotomicrografia do grupo ROG. (A) Área de formação osteóide na região central da membrana, com resquício da membrana (seta) e fibras conjuntivas dispostas paralelas. (B) Área de vasos sanguíneos no interior da membrana (asterisco) e regiões de osso neoformado (quadrado), 40x, T.M.

O Grupo ROG/LB apresentou tecido ósseo estendendo-se em direção ao centro do defeito. Em um dos espécimes do Grupo ROG/LB ocorreu a manutenção da espessura da calvária original (Figura 21). Em outro espécime ocorreu fechamento ósseo em extensão do defeito cirúrgico, porém a espessura não foi mantida (Figura 22). Resquícios da membrana foram observados, além de áreas de ossificação da membrana (Figura 23a) frequentemente ultrapassando os limites da espessura da calvária, inclusive em regiões sobre o osso original (Figuras 23b, 23c), e com bastante componente medular (Figura 24a). O tecido conjuntivo apresentava-se bem organizado, denso em algumas áreas, e com fibras colágenas paralelas e bastante fibroblasto (Figura 25b).

Figura 21 – Região central do defeito no grupo ROG/LB com formação óssea além da espessura original da calvária. 20x, HE.

Figura 22 – Fotomicrografia do grupo ROG/LB. Fechamento do defeito cirúrgico em extensão, porém sem manutenção da espessura original da calvária. 4x, HE.

Figura 23- Fotomicrografia do grupo ROG/LB. (A) Área de ossificação da membrana na região central do defeito e com resquícios da membrana. 20x, TM. (B) Osso neoformado na extremidade do defeito cirúrgico e na região da membrana, sobre a margem óssea original da calvária. 20x, TM. (C) Osso neoformado com vários espaços medulares sobre o limite ósseo original do defeito.40x, TM.

Figura 24 – Fotomicrografia do grupo ROG/LB. (A) Tecido ósseo neoformado na região central da membrana com vários espaços medulares, 40x, T.M. (B) Fibras colágenas bem organizadas na região central do defeito, entre as margens de tecido ósseo neoformado. 40x, TM.

Nos defeitos tratados com BO isoladamente, foram preenchidos em parte com novo osso, porém o osso não se estendeu até o centro do defeito em nenhum dos espécimes. Ocorreu a manutenção da espessura da calvária, e as partículas do material ocuparam a área do defeito criado originalmente, circundadas com tecido conjuntivo organizado e com fibras colágenas paralelas. Ocorreu a manutenção da espessura original da calvária, apesar de pouca quantidade de osso neoformado (Figura 25). Em algumas áreas foi observada a presença de osteoclastos ao redor de partículas do BO, e o tecido conjuntivo se apresentou organizado (Figura 26).

Figura 25- Fotomicrografia do grupo BO. Manutenção da espessura da calvária, com bastante partículas remanescentes e pouco tecido ósseo neoformado. 4x, HE.

Figura 26- Partícula do grupo BO, envolta por tecido conjuntivo com fibras paralelas. Presença de osteoclasto na periferia da partícula, 40x. HE.

Na associação do BO ao LB (Grupo BO/LB) ocorreu a formação de osso em extensão ao centro do defeito, e fechamento em três espécimes. Porém, não foi observado completo fechamento em área. Assim como nos demais grupos em que BO foi utilizado, a espessura da calvária original foi mantida, uma vez que as partículas estavam contidas no defeito originalmente criado (Figura 27). Foi observado início da formação óssea dentro das partículas (Figura 28). O tecido conjuntivo apresentava-se organizado ao redor das partículas (Figura 29).

Figura 27- Fotomicrografia do grupo BO/LB . Manutenção da espessura da calvária, com extensão de novo osso em direção ao centro do defeito cirúrgico criado. 4x, HE.

Figura 28 – Formação óssea no interior e entre partículas de BO, 40x. HE.

A

B

Figura 29- Fotomicrografia do grupo BO/LB. (A) Presença de vasos sanguíneos. (A,B) Tecido conjuntivo organizado entre as partículas de BO. 40x, T.M.

O Grupo BO/ROG apresentou formação óssea em extensões variáveis, porém em nenhum espécime ocorreu fechamento ósseo em extensão. Foi mantida a espessura da calvária original, bem como o defeito preenchido por partículas de BO (Figura 30). Resquícios da membrana foram observados, além de áreas de ossificação da mesma. Osteoclastos foram observados ao redor de partículas de BO. O tecido conjuntivo apresentava-se bem organizado entre as partículas de BO (Figura 31).

Figura 30- Fotomicrografia do Grupo BO/ROG. A espessura da calvária foi mantida e há formação de novo osso na região da membrana. 4x.,HE.

Figura 31- Fotomicrografia do Grupo BO/ROG. Tecido conjuntivo com fibras colágenas paralelas.20x,TM.

Quando associado o BO à ROG e irradiados com LB (Grupo BO/ROG/LB) em vários espécimes o osso se estendia em direção ao centro do defeito cirúrgico, porém sem fechamento do defeito. Áreas de ossificação da membrana foram observadas com frequência e ultrapassando os limites da calvária original (Figura 32), além de alguns resquícios da membrana. Partículas de BO foram mantidas no defeito cirúrgico e envolvidas por novo osso em alguns espécimes, e em um espécime foi observado formação de matriz osteóide no interior da partícula de BO (Figura 33). Em todos os espécimes, a espessura da calvária original se manteve, e não ocorreu perda de partículas do material. O tecido conjuntivo apresentava fibras paralelas, com bastante fibroblastos e bem vascularizado (Figura 34).

Figura 32. Fotomicrografia do Grupo BO/ROG/LB. Formação óssea estendendo-se em direção ao centro do defeito cirúrgico, mantendo a espessura da calvária. 4x, HE.

Figura 33- Fotomicrografia do Grupo BO/ROG/LB. Formação de matriz osteóide no interior da partícula de BO. 40x, HE.

Figura 34- Fotomicrografia do Grupo BO/ROG/LB. Fibras colágenas bem organizadas ao redor das partículas, e ossificação da membrana. 20x, HE.

5.2 Análise Histométrica e estatística

A análise estatística descritiva dos valores de AON e ELO estão representadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1- Média, desvio-padrão, Q25, mediana e Q75 dos valores de área de osso neoformado em % (AON)

Grupo	N	Média	Desvio-Padrão	Q25	Mediana	Q75
C	9	9,96	4,49	6,64	9,52	14,32
LB	7	47,67	8,66	43,96	44,58	55,41
BO	10	11,36	7,89	6,22	9,49	16,66
ROG	8	47,43	15,73	35,6	39,26	63,74
BO/ROG	9	21,98	10,70	15,78	19,93	25,97
BO/LB	10	48,57	28,22	22,4	42,22	77,97
ROG/LB	7	65,76	7,62	60,61	64,09	74,53
BO/ROG/LB	10	20,46	13,14	9,96	15,5	30,64

Tabela 2- Análise estatística descritiva de ELO (% em relação à AT). Média, desvio-padrão, Q25, mediana, Q75.

Grupo	N	Média	Desvio-Padrão	Q25	Mediana	Q75
C	9	16,00	9,86	9,34	12,50	20,55
LB	7	76,55	15,54	63,49	69,89	94,13
BO	10	27,38	15,54	15,78	23,60	40,87
ROG	8	81,41	12,17	71,47	81,90	90,4
BO/ROG	9	62,87	21,62	42,22	71,94	80,44
BO/LB	10	73,17	24,87	50,14	79,41	100
ROG/LB	7	92,04	5,85	84,78	93,27	96,38
BO/ROG/LB	10	48,90	21,79	23,96	57,08	68,09

O Grupo ROG/LB apresentou as maiores médias de AON ($65,76 \pm 7,62\%$) e ELO ($92,04 \pm 5,85\%$), enquanto as menores foram do Grupo C ($9,96 \pm 4,49$ e $16,00 \pm 9,86$, respectivamente). Para todas as variáveis avaliadas foram encontradas diferenças estatísticas entre as médias após realização do Teste ANOVA. As comparações múltiplas de AON e ELO foram submetidas ao Teste de Tukey e as diferenças estão representadas nas tabelas 3 a 12.

A análise comparativa das médias de AON e ELO dos grupos que receberam tratamento com o Grupo C estão apresentadas nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3 – Comparação múltipla dos valores de AON (%) entre os grupos tratados e o Grupo C.

Grupos	Média das diferenças	Intervalo de Confiança
C - LB	- 37,71*	- 60,66 a -14,76
C - BO	- 1,41	- 22,33 a 19,52
C - ROG	- 37,47*	- 59,60 a -15,34
C – BO/LB	-38,60*	-59,53 a -17,68
C – ROG/LB	- 55,79*	- 78,75 a -32,84
C – BO/ROG	- 12,02	- 33,49 a 9,44
C – BO/ROG/LB	-10,50	- 31,96 a 10,97

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

Tabela 4 – Comparação múltipla dos valores de ELO (%) entre o Grupo C e os demais.

Grupos	Média das diferenças	Intervalo de Confiança
C - LB	- 60,55*	- 88,40 a - 32,71
C - BO	- 11,38	- 36,77 a 14, 01
C - ROG	- 65,41*	- 92,26 a -38,56
C – BO/LB	- 57,18*	- 82,56 a -31,79
C – ROG/LB	- 76,04*	- 103,9 a -48,20
C – BO/ROG	- 46,88*	- 72,92 a -20,83
C – BO/ROG/LB	-32, 90*	- 58,29 a -7,51

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas das médias de AON apenas do grupo BO ($11,36 \pm 7,89\%$) quando comparadas às do Grupo C ($9,96 \pm 4,46\%$) (Tabela 3). Todos os grupos, exceto o Grupo BO, apresentaram diferenças estatisticamente significativas em ELO quando comparados ao Grupo C (Tabela 4).

Nas tabelas 5 e 6 podem ser observadas as comparações das médias de AON e ELO, respectivamente, do Grupo LB com os demais grupos tratados.

Tabela 5 – Comparação múltipla dos valores de AON (%) entre o Grupo LB e os demais.

Grupos	Média das diferenças	Intervalo de Confiança
LB – BO	36,31*	13,87 a 58,75
LB – ROG	0,23	-23,33 a 23,81
LB – BO/LB	-0,89	-23,34 a 21,55
LB – ROG/LB	-18,08	-42,43 a 6,25
LB – BO/ROG	25,69*	2,73 a 48,64
LB–BO/ROG/LB	27,21*	4,26 a 50,16

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quanto à AON quando comparado o Grupo LB ($47,67 \pm 8,66\%$) com os grupos BO ($11,36 \pm 7,89$), BO/ROG ($21,98 \pm 10,70$) e BO/ROG/LB ($22,46 \pm 13,14$) (Tabela 5).

Tabela 6 – Comparação múltipla dos valores de ELO (%) entre o Grupo LB e os demais.

Grupos	Média das diferenças	Intervalo de Confiança
LB – BO	49,17*	21,94 a 76,41
LB – ROG	-4,86	-33,46 a 23,74
LB – BO/LB	3,37	-23,85 a 30,61
LB – ROG/LB	-15,49	-45,03 a 14,05
LB – BO/ROG	13,68	-14,17 a 41,52
LB–BO/ROG/LB	27,65*	0,41 a 54,88

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

A média de ELO do Grupo LB foi $76,55 \pm 15,54$, e ocorreu diferença estatisticamente significativa em relação aos Grupos BO ($27,38 \pm 15,54$) e BO/ROG/LB ($48,90 \pm 21,79$) (Tabela 6).

As comparações das médias de AON e ELO do Grupo BO com os grupos ROG, BO/LB, ROG/LB, BO/ROG e BO/ROG/LB estão demonstradas nas tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7 – Comparação múltipla dos valores de AON (%) entre o Grupo BO e os demais

Grupos	Média das diferenças	Intervalo de Confiança
BO - ROG	-36,07*	- 57,67 a -14,47
BO - BO/LB	-37,20*	- 57,57 a -16,84
BO - ROG/LB	-54,39*	- 76,84 a -31,95
BO - BO/ROG	-10,62	- 31,55 a 10,30
BO - BO/ROG/LB	-9,09	- 30,02 a 11,83

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

Apenas os grupos BO/ROG e BO/ROG/LB não apresentaram diferenças estatisticamente significativas de AON quando comparados ao Grupo BO (Tabela 7).

Tabela 8 – Comparação múltipla dos valores de ELO (%) entre o Grupo BO e os demais

Grupos	Média das diferenças	Intervalo de Confiança
BO - ROG	-54,03*	- 80,25 a -27,82
BO - BO/LB	-45,8*	- 70,51 a -21,09
BO - ROG/LB	-64,67*	- 91,90 a -37,44
BO - BO/ROG	-35,5*	-60,89 a -10,11
BO - BO/ROG/LB	-21,53	- 46,24 a 3,18

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$.

Na comparação das médias de ELO, os grupos ROG, BO/LB, ROG/LB E BO/ROG apresentaram diferenças estatisticamente significativas com o grupo BO (Tabela 8).

A comparação das médias de AON e ELO do grupo ROG isoladamente ou associado ao LB com os demais grupos está representada nas tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9 – Comparação múltipla dos valores de AON (%) entre o Grupo ROG e ROG/LB com os demais

Grupos	Média das diferenças	Intervalo de Confiança
ROG - BO/LB	-1,13	- 22,73 a 20,47
ROG - ROG/LB	-18,32	- 41,89 a 5,24
ROG - BO/ROG	25,45*	3,31 a 47,58
ROG - BO/ROG/LB	26,98*	4,84 a 49,10
ROG/LB - BO/ROG	43,77*	20,82 a 66,72
ROG/LB - BO/ROG/LB	45,3*	22,35 a 68,25

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

Nos grupos em que a membrana foi associada ao OB (Grupos BO/ROG e BO/ROG/LB) ocorreram diferenças estatisticamente significativas quanto às médias de AON, em relação ao Grupo ROG. O Grupo ROG/LB apresentou média de AON maior que a dos demais grupos, com diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos BO/ROG e BO/ROG/LB (Tabela 9).

Tabela 10 – Comparação múltipla dos valores de ELO (%) entre o Grupo ROG e os demais

Grupos	Média das diferenças	Intervalo de Confiança
ROG - BO/LB	8,23	- 17,97 a 34,45
ROG - ROG/LB	-10,63	- 39,23 a 17,97
ROG - BO/ROG	18,54	-8,31 a 45,39
ROG - BO/ROG/LB	32,51*	6,29 a 58,72
ROG/LB - BO/ROG	29,17*	1,32 a 57,02
ROG/LB - BO/ROG/LB	43,14*	15,91 a 70,37

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

O Grupo ROG apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo BO/ROG/LB, quando comparadas as médias de ELO. Quando comparadas as médias de ELO do Grupo ROG/LB com os demais, ocorreu diferença estatisticamente significativa na comparação com os Grupos BO/ROG e BO/ROG/LB (Tabela 10).

As comparações das médias de AON e ELO do grupo BO/LB e BO/ROG com os demais estão apresentadas nas tabelas 11 e 12, respectivamente.

Tabela 11 – Comparação múltipla dos valores de AON (%) dos Grupos BO/LB e BO/ROG com os demais

Grupos	Média das diferenças	Intervalo de Confiança
BO/LB - ROG/LB	-17,19	-39,63 a 5,25
BO/LB - BO/ROG	26,58*	5,65 a 47,51
BO/LB - BO/ROG/LB	28,11*	7,18 a 49,03
BO/ROG - BO/ROG/LB	1,52	-19,94 a 23,00

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias de AON quando comparados os grupos BO/LB e BO/ROG, e BO/LB com BO/ROG/LB.

Tabela 12 – Comparação múltipla dos valores de ELO (%) dos Grupos BO/LB e BO/ROG com os demais

Grupos	Média das diferenças	Intervalo de Confiança
BO/LB - ROG/LB	-18,87	-46,10 a 8,36
BO/LB - BO/ROG	10,30	-15,09 a 35,69
BO/LB - BO/ROG/LB	24,27	- 0,44 a 48,98
BO/ROG - BO/ROG/LB	13,97	-11,42 a 39,36

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas das médias de ELO dos Grupos BO/LB e BO/ROG com os demais.

As médias de APR podem ser observadas na Tabela 13. As comparações múltiplas de APR do grupo BO e BO/LB com os demais são observadas na tabela 14.

As comparações múltiplas demonstram maior APR nos defeitos tratados com BO isoladamente ($38,73 \pm 6,95\%$) em relação aos demais grupos, exceto o BO/ROG ($32,33 \pm 6,25$). As diferenças foram estatisticamente significativas quando comparado BO com os grupos BO/LB, e BO/ROG/LB, e na comparação entre os grupos BO/LB e BO/ROG.

Tabela 13- Média, desvio-padrão dos valores de APR (%).

Grupo	N	Média	Desvio-Padrão	Q25	Mediana	Q75
BO	10	38,73	6,95	33,52	37,71	43,17
BO/LB	10	16,74	15,25	0	22,42	28,52
BO/ROG	9	32,33	6,25	29,70	32,40	37,74
BO/ROG/LB	9	24,21	6,06	17,28	26,85	28,71

Tabela 14 – Comparação múltipla dos valores de APR (%)

Grupos	Média das diferenças	Intervalo de Confiança
BO - BO/LB	21,99*	10,49 a 33,48
BO - BO/ ROG	6,40	-5,40 a 18,21
BO - BO/ROG/LB	14,52*	3,02 a 26,01
BO/LB - BO/ROG	- 15,58*	-27,39 a -3,77
BO/LB - BO/ROG/LB	- 7,46	-18,96 a 4,02
BO/ROG - BO/ROG/LB	8,11	-3,69 a 19,92

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A associação do BO à ROG com ou sem o uso do LB promoveu maior formação óssea em extensão, mas não maior AON quando comparado ao Grupo Controle. O osso bovino não aumentou a área de formação óssea promovida quando utilizada a ROG, porém ocorreu a manutenção da espessura da calvária nos grupos que utilizaram Bio-Oss®.

A utilização de enxertos ósseos ou seus substitutos para preservação do tecido ósseo tem sido muito discutido na literatura. Vários estudos tem demonstrado que o preenchimento de defeitos ósseos apenas com coágulo tem resultado em perda da arquitetura óssea (Pietrokovsky et al., 1967; Schropp et al., Nevins et al., 2006). Estes achados corroboram com os encontrados no presente estudo no qual o Grupo Controle apresentou os piores resultados de AON e ELO com perda da espessura da calvária original.

Atualmente técnicas que visam beneficiar e acelerar o reparo ósseo diminuindo o tempo de tratamento tem sido amplamente pesquisadas. A utilização do LB é uma das possíveis terapias coadjuvantes neste processo (Pereira et al., 2009; Tajali et al., 2010). O uso do LB é considerado como promissor, pois trata-se de um método não invasivo que estimula a osteogênese e reduz o tempo de consolidação de fraturas (Pinheiro & Gerbi, 2006; Renno et al., 2010; Fangel et al., 2011).

Neste estudo a utilização do LB isoladamente, levou a maior formação óssea em área e extensão que o grupo controle, porém não manteve a espessura da calvária original. Takeda et al. 1988 observaram que em alvéolos de extração de ratos ocorreu aumento da deposição óssea com a utilização LB, sugerindo que o LB estimula o processo de cicatrização óssea. Vários outros estudos que avaliaram o efeito do LB no tecido ósseo também demonstraram efeito positivo do LB no contato osso-implante (Khadra et al., 2004), na associação com proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (Rosa et al., 2012), com BO (Cunha et al., 2014) ou osso autógeno (de Almeida et al., 2014).

Alguns autores não consideram a utilização clínica do LB como vantajosa economicamente pela necessidade de várias aplicações, o que demanda vários retornos do paciente. O LB seria desejável em situações nas quais o reparo ósseo é comprometido por situações sistêmicas ou locais desfavoráveis (Pereira et al., 2009).

O ideal seria que uma única aplicação do LB promovesse melhores resultados e acelerasse o processo de cicatrização. Partindo-se desta premissa foi utilizado no presente estudo apenas uma aplicação do LB. Outro fato que tem sido muito discutido na literatura refere-se ao desenho experimental, uma vez que o LB pode apresentar efeitos sistêmicos e

interferir nos resultados das terapias (Mester et al., 1971; Braverman et al., 1989; Gerbi et al. 2005) nos casos em que são realizados defeitos com e sem aplicação de laser no mesmo animal (Pinheiro et al., 2013; Gharoudhi et al 2014).

Quando o LB a biomateriais, tem sido relatado que o processo de formação óssea na interface com o osso ocorre de forma similar à consolidação de fraturas (Glowacki & Spector, 1991; Søballe, 1993). O aumento da vascularização e estímulo do fluxo sanguíneo, recrutamento e ativação de osteoblastos, síntese de matriz e os efeitos anti-inflamatórios do LB podem ser considerados efeitos positivos na osteointegração dos biomateriais (Dortbudak et al., 2000; Nicolau et al., 2003).

Os substitutos ósseos tem sido empregados com intuito de regenerar o tecido ósseo nos casos de alvéolos de extração, defeitos horizontais e verticais de rebordo. O BO é um dos materiais mais pesquisados como substituto ósseo na terapia regenerativa (Hallmen & Thor, 2008).

Existem evidências de que apesar do BO ser considerado um bom material para ser associado à ROG, ainda há controvérsias a respeito da capacidade resorptiva de suas partículas (Galindo Moreno et al., 2013). Alguns autores consideram o BO como não reabsorvível, uma vez que necessita de 3 a 6 anos para ser reabsorvido. Isto poderia ser desfavorável no processo de cicatrização óssea uma vez que os grânulos não reabsorvidos poderiam interferir negativamente na formação de novo osso (Tamimi et al. 2006; Erziganli et al., 2013; Erziganli et al., 2014), entretanto quando alvéolos de extração foram tratados clinicamente com BO formação óssea em qualidade e quantidade foi suficiente para instalação de implante em posição correta, com manutenção da espessura do alvéolo (Carmagnola et al., 2003) apesar de atrasar o processo de cicatrização segundo estudos realizados em cães (Araújo et al., 2008; Araújo & Lindhe, 2009; Araújo et al., 2010) similar ao que ocorreu neste estudo em defeitos de calvária.

Muito tem sido questionado quanto ao potencial de reabsorção do BO e formação de novo osso (Hallman & Thor, 2008). Com ausência de componentes orgânicos, o BO possui autênticos cristais de hidroxiapatita, e pode permitir a inserção de osteoblastos e deposição de matriz óssea (Tapety et al., 2004). A microestrutura da superfície do BO pode afetar ainda a deposição de proteínas osteogênicas e subsequentemente beneficiar a formação óssea na sua superfície. Tapety et al. (2004) avaliaram a cronologia histológica de formação óssea em defeitos em fêmur de ratos preenchidos com BO. Os autores demonstraram que o BO funcionou como arcabouço para células osteogênicas e ocorreu diferenciação osteoblástica e produção de matriz óssea (mimetizando a matriz do osso primitivo). Aos 7 e 14 dias foram

encontrados na superfície do osso neoformado muitos osteoblastos positivos para fosfatase alcalina (ALP) e osteoclastos reativos para TRAP (Fosfatase ácida tartrato resistente), sugerindo remodelação óssea local. Assim, a presença do osso bovino parece não afetar a remodelação óssea fisiológica, e levar à formação óssea nas fases iniciais da cicatrização, sendo este material considerado desejável na terapia regenerativa.

A utilização de BO isoladamente, no presente estudo, foi efetiva para manutenção da espessura da calvária no período avaliado, o que não ocorreu no grupo controle apesar disso, não propiciou maior AON e ELO. Clinicamente, a manutenção da espessura do rebordo é uma característica importante no tratamento reabilitador. Em áreas de defeitos ósseos em espessura e fenestrações, sua transformação em cortical óssea com aspecto convexo é indicação para manter estabilidade no momento da instalação do implante (Artzi et al., 2001). O principal benefício clínico de um substituto ósseo é funcionar como bom arcabouço, propiciando a estabilização do coágulo na fase de cicatrização inicial além de possuir estrutura tridimensional para que a regeneração óssea aconteça em período maior de tempo (Polimeni et al., 2004).

Um estudo em animais demonstrou ainda que as partículas ósseas não devem exceder 125 μm de tamanho para prevenir sua remoção por macrófagos (Zaner & Yukna, 1984). Klüppel et al.(2013) demonstraram em calvária de coelhos, que partículas de BO menores que 450 μm foram reabsorvidas mais intensamente, com maior formação de matriz osteóide do que aquelas com tamanho médio (450 a 749 μm) e grande (750 a 1000 μm). No presente estudo, foi utilizada o BO com partículas de menor tamanho disponíveis para comercialização, variando de 250 μ a 1000 μm , Essa variação no tamanho das partículas do material poderia ser um viés e influenciar os resultados.

Uma técnica regenerativa denominada “técnica de sanduíche” foi descrita por Wang et al., em 2004 na qual são utilizados materiais de enxerto ósseo com diferentes padrões de reabsorção em uma sequência pré-determinada e associados a membrana ao redor de defeitos ósseos em implantes. Neste caso é geralmente utilizado inicialmente na proximidade da base do defeito o osso autógeno, pelo seu potencial osteogênico seguido pelo osso alógeno desmineralizado congelado seco (DFDBA) que contém proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e finalmente, na camada mais externa BO 2 a 3 mm além do nível ósseo adjacente. O BO atua como arcabouço para formação óssea, preservando ou mantendo espaço para se obter mais neoformação óssea. É utilizada então membrana, preferencialmente colágena. Os resultados clínicos são bastante favoráveis de acordo com os autores e parecem melhorar os

resultados clínicos da ROG por utilizar propriedades positivas de diferentes materiais (Wang et al., 2004).

Se menores partículas de BO levam a mais rápida formação de matriz osteóide (Kluppel et al., 2013), seria interessante avaliar futuramente a técnica de “sanduíche” descrita por Wang et al. 2004 com diferentes tamanhos de partículas de BO. Assim, poderia ser substituído o osso autógeno preconizado na técnica original, por partículas de BO com menor tamanho. Uma das formas de acelerar a formação óssea, foi demonstrada no presente estudo com a irradiação das partículas de BO utilizando o protocolo de laser proposto por Cunha et al. (2014). A irradiação pelo LB destas partículas menores poderia ser uma alternativa interessante, dada a proximidade que se encontraria com as margens do defeito cirúrgico, onde o potencial osteogênico do osso autógeno é maior.

A utilização de substitutos ósseos isoladamente poderia diminuir a formação óssea, seja pelo deslocamento de partículas do material ou pela proliferação mais rápidas das células de tecidos indesejáveis na região do defeito. De acordo com alguns relatos na literatura, materiais de enxertia associados com membranas propiciam melhores resultados que o enxerto isoladamente (Nyman et al., 1990; Wilson & Buser, 1994; von Arx, 1994; Shanaman, 1994; Saadoun & Le Gall, 1994; Rominger & Triplett, 1994; Nevins & Mellonig, 1994). Entretanto, os resultados podem variar de acordo com os diferentes tipos de materiais de enxerto (Wang et al., 2004) e membranas utilizados (Owens et al., 2001).

Donos et al. (2004) avaliaram a ROG associada a BO em calvária de ratos, demonstrou que partículas de BO após 4 meses de cicatrização, estavam envolvidas por tecido conjuntivo fibroso. A duração da membrana reabsorvível não foi longa o suficiente para alcançar os objetivos esperados e discreta concavidade foi observada na região central dos defeitos tratados apenas com ROG, porém todos os defeitos fecharam em extensão, com formação óssea. Apesar disso, ocorreu a perda da espessura da calvária na ROG. Os grupos tratados com BO/ROG ou BO/ROG associada a EMD (proteínas derivas da matriz do esmalte) fecharam em extensão e foi mantida uma forma convexa da calvária no centro do defeito, porém com remanescentes de BO envolvidos por tecido conjuntivo. Os autores concluíram que a previsibilidade da neoformação óssea parece estar na dependência da utilização de ROG.

Em contrapartida, um estudo realizado em animais demonstrou que tanto o osso bovino (Bio-Oss®) quanto o vidro bioativo (Biogran®) prejudicaram a formação óssea ao ser associado à ROG na avaliação de 1 ano. Os autores relataram que a reabsorção de partículas não progrediu e o osso bovino estava em contato direto com o osso neoformado, que cresceu

em continuidade com as partículas do material totalmente incorporadas em muitos casos (Stavropoulos et al, 2003). Os autores concluem que o uso do BO ou vidro bioativo como adjunto à ROG em situação clínica com risco de colapso da membrana ainda necessita ser determinado.

Vários estudos relatam que uma das desvantagens na utilização de membranas colágenas é a não manutenção de espaço na área a ser regenerada (Ozmeric, 2000; Dupoirieux et al., 2001) e devendo esta membrana ser associada a substitutos ósseo (Brunel et al., 2001; Camelo et al., 2001).

No presente estudo, os grupos que utilizaram ROG isoladamente ou associado ao LB demonstraram maior área e extensão de osso neoformado que o grupo Controle. Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os dois tratamentos (ROG e ROG/LB), maior formação óssea foi observada nos grupos em que o LB foi associado a ROG. Foi observado em mais espécimes novo osso se estendendo em direção ao centro do defeito cirúrgico, e com maior espessura, além de maior ossificação e menor quantidade de remanescente da membrana. Não há na literatura outros estudos que avaliaram ROG associada ao LB, mas comprovou-se histologicamente neste estudo que esta associação promoveu formação óssea no interior da membrana, podendo proporcionar uma amplificação da sua função pois segundo Owens et al (2001) as membranas colágenas tem taxa de reabsorção variando em intervalos de tempos menores que o necessário para a completa regeneração óssea.

A associação do LB à ROG demonstrou ser vantajosa neste estudo, com maior formação óssea em área quando comparada aos grupos que utilizaram apenas BO ou BO associado à ROG. Nos grupos que utilizaram substituto ósseo, foi verificada menor área de formação óssea no tempo de cicatrização estudado. Dessa forma, o LB pode ter acelerado o processo de cicatrização óssea, e com isso, melhorado os resultados dos materiais isoladamente e também da membrana.

Num estudo em que foi associado o LB ao osso bovino (Genox® Baumer, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil) e ROG (GenDerm® Baumer, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil.) foi demonstrado efeito positivo nos grupos irradiados com LB e associados ao osso bovino, independente da utilização de ROG (Pinheiro et al., 2003). No presente estudo, a utilização de LB associado ao BO propiciou maior AON que os grupos C, BO e BO/ROG. Ainda, no grupo BO/LB foi observada menor quantidade de partículas no tempo avaliado quando comparado ao BO isoladamente, com manutenção da espessura da calvária em ambos os grupos. corroborando com os achados de Pinheiro et al. (2003) quanto a formação óssea nos grupos

irradiados. Entretanto algumas diferenças metodológicas com o estudo de Pinheiro et al. (2003) devem ser evidenciadas pois o mesmo utilizou múltiplas aplicações de LB, substituto ósseo e membrana de ROG não consagradas na literatura, dificultando comparações quanto ao real efeito de cada terapia isolada ou da associação de forma precisa.

O BO atuando como bom arcabouço associado à ROG também poderia ter seus efeitos melhorados pelo LB. Estudos “in vitro” demonstraram que o LB atua em osteoblastos, aumentando a síntese de matriz óssea (Nicolau et al., 2003). No presente estudo a associação do BO a ROG com ou sem a utilização do LB, promoveu maior formação óssea em extensão, mas não maior Aon quando comparado ao grupo controle, porém ocorreu a manutenção da espessura da calvária nos grupos que utilizaram BO. Na análise histológica, maior mineralização da membrana e formação óssea além da espessura da calvária foi demonstrada no Grupo BO/ROG/LB em relação ao BO/ROG.

Alguns autores sugerem que seja associado BO com osso autógeno e ROG para acelerar a formação óssea (Maiorana et al. 2005). Porém, não eliminaria a necessidade de um segundo sítio cirúrgico. O uso do LB associado à membrana colágena, no presente estudo, demonstrou ser uma boa alternativa para melhorar a cicatrização e a função de barreira da membrana, pois na maioria dos espécimes foi evidenciado mineralização da membrana, e na terapia conjunta (BO/ROG/LB) os resultados foram ainda melhores com manutenção da espessura da calvária.

Gerbi et al. (2005) ao avaliar o papel do LB associado à ROG observaram que o LB possui um efeito modulatório positivo na cicatrização de defeitos ósseos em fêmur de ratos quando associado ao OB e ROG. Entretanto, o estudo utilizou defeitos pequenos, análises apenas qualitativas, não testar todas as modalidades terapêuticas isoladamente, e utilizar materiais não reconhecidos internacionalmente.

A associação de materiais com o LB pode ser desejável, uma vez que a terapia tripla (BO/ROG/LB) neste estudo levou a maior formação óssea em área e espessura que o grupo controle. Não ocorreu maior formação óssea em BO/ROG/LB comparado ao BO/ROG. Porém, existem relatos que o LB em conjunto com material de enxerto e ROG aumenta a concentração de hidroxiapatita de Cálcio, o principal substrato para a estrutura óssea, e propiciar maior maturação óssea (Pinheiro et al., 2006; Gerbi et al., 2005; Lopes et al., 2005).

Diante do exposto, poderia ser questionado as vantagens de associar o LB à terapia já proposta BO/ROG. Entretanto, o LB parece melhorar a qualidade óssea, com maior formação de osso na região da membrana ultrapassando os limites do defeito originalmente criado. Clinicamente, acelerar o tratamento reabilitador é um desafio e importante objetivo clínico almejado (Khadra et al., 2004), e a utilização do LB é uma modalidade terapêutica que pode ser associada aos procedimentos de regeneração óssea.

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

A associação do LB ao BO/ROG, não aumentou significativamente a área e a extensão de formação óssea em relação ao BO/ROG, e a quantidade de partículas remanescentes foram similares aos 30 dias. Entretanto, na análise histológica o LB associado a ROG e BO/ROG demonstrou maior formação óssea na região da membrana.

Referências

REFERÊNCIAS

Adeyemo WL, Reuther T, Bloch W, Korkmaz Y, Fischer JH, Zöller JE, et al. Healing of onlay mandibular bone graft covered with collagen membrane or bovine bone substitutes: a microscopical and immunohistochemical study in the sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008; 37: 651-9.

Anneroth G, Hall G, Ryden H, Zetterqvist L. The effect of low-energy infra red laser radiation on wound healing in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1998; 26:12-17.

Anneroth G, Hall G, Rydén H, Zetterqvist L. The effect of low-energy infrared laser radiation on wound healing in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1988; 26:12-17.

Antoun H, Sitbon JM, Martinez H, Missika P. A prospective randomized study comparing two techniques of bone augmentation: onlay graft alone or associated with a membrane. *Clin Oral Impl Res* 2001; 12: 632-639.

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

Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 212-218.

Araújo MG, Carmagnola D, Berglundh T, Thilander B, Lindhe J. Orthodontic movement in bone defects augmented with Bio-Oss. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2001;28(1):73-80.

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

Araújo MG, Linder E, Lindhe J. Bio- Oss collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. *Clinical Oral Impl Res* 2011; 22: 1-8.

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

Araújo MG, Sonohara M, Hayacibara R, Cardaropoli G, Lindhe J. Lateral ridge augmentation by the use of grafts comprised of autologous bone or a biomaterial. An experiment in the dog. *J Clin Periodontol* 2002; 29(12):1122-1131.

Araújo MG, Wennström JL, Lindhe J. Modeling of the buccal and lingual bone walls of fresh extraction sites following implant installation. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(6):606-614.

Artzi Z, Nemcovsky CE, Tal H. Efficacy of porous bovine bone mineral in various types of osseous deficiencies: clinical observations and literature review. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001; 4: 395-405.

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

Artzi Z, Weinreb M, Tal H, Nemcovsky CE, Rohrer MD, Prasad HS, Kozlovsky A. Experimental intrabony and periodontal defects treated with natural mineral combined with a synthetic cell-binding peptide in the canine: morphometric evaluations. *J Periodontol.* 2006; 77: 1658–1664

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

Barboza E, Oliveira de Souza R, Caula A, Neto LG, Caula F, Duarte ME. Bone regeneration of localized chronic alveolar defects utilizing cell binding peptide associated with ABD bone mineral. *J Periodontol* 2002; 73: 1153–1159.

Barushka O, Yaakobi T, Oron U. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. *Bone.* 1995; 16(1):47-55.

Basford JR. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med* 1995; 16:331–342.

Bassett CA, Creighton DK, Stinchfield FE. Contributions of endosteum, cortex and soft tissues to osteogenesis. *Surg Gynecol Obstet* 1961; 112: 145-152.

Bassett CA. Environmental and cellular factors regulating osteogenesis. *Bone Biodinamics* 1966; 233-244.

Beltrán V, Engelke W, Dias FJ, Leiva C, Fuentes R, Borie E. Occlusive barriers in combination with particulate Bio-Oss® graft: a pilot study on rabbit calvaria. *Int J Clin Exp Med.* 2014;15(7):1714-1720.

Benedicenti A. *Manuale di Laser-Terapia del Cavo Orale*. Ed. Maggioli, Rimini, 1982.

Benke D, Olah A, Mohler H. Protein-chemical analysis of Bio-Oss bone substitute and evidence on its carbonate content. *Biomaterials* 2001; 22: 1005–1012.

Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Impl Res* 1997; 8(2): 117-124.

Bosch C, Melsen B, Gibbons R, Vargervik K. Human recombinant transforming growth factor-beta 1 in healing of calvarial bone defects. *J Craniofacial Surg* 1996; 7: 300–310.

Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofacial Surg*.1998;9:310-316.

Boyce BF, Rosenberg E, de Papp AE, Duong le T. The Osteoclast, Bone Remodelling and Treatment of Metabolic Bone Disease. *Eur J Clin Invest*. 2012;42(12):1332-1341.

Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone: the influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am* 1999;30:571—81.

Boyne PJ, Mikeis TE. Restoration of alveolar ridges by intramandibular fronsposition osseous grafting, *J Oral Surg*. 1968; 20:569-576.

Boyne PJ. Restorotion of osseous defects in moxiliofociol casualties. *J Am Dent Assoc*. 1969; 78: 767-770.

Braverman B, McCarthy RJ, Ivancovich AD, Forde DE, Overfield M, Bapna MS. Effect of helium-neon and infrared laser on wound healing in rabbits. *Lasers Surg. Med*. 1989; 9:50–58.

Brunel G, Brocard D, Duffort JF, Jacquet E, Justumus P, Simonet T, Benqué E. Bioabsorbable materials for guided bone regeneration prior to implant placement and 7-year follow-up: report of 14 cases. *J Periodontol* 2001; 72 (2): 257-264.

Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen Membranes: A Review. *J Periodontol* 2001; 72:215-229.

Burg KJL; Porter S; Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21: 2347-59.

Buser D, Dula K, Belser UC, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1995; 15:11 -29.

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

Buser D, Dula K, Belser UC, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical Procedure in the mandible. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1995; 15: 11-29.

Buser D, Dula K, Belser UC, Hirt HP, Bertold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxila. . *Int J Periodontics Restorative Dent* 1993; 13(1): 29-45.

Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996; 54(4):420-32.

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. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001; 21:109-119.

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. *Int J of Periodontics Restorative Dent* 2001; 21: 109–119.

Cardaropoli G, Araújo M, Hayacibara R, Sukekava F, Lindhe J. Healing of extraction sockets and surgically produced- augmented and non-augmented – defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2005; 32:435-440.

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

Chiapasco M, Abati S, Romeo E, Vogel G. Clinical outcome of autogenous bone blocks or guided bone regeneration with e-PTFE membranes for the reconstruction of narrow edentulous ridges. *Clin Oral Impl Res* 1999; 10 (4): 278-288.

Chiapasco M, Zaniboni M. Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri-implant dehiscences and fenestrations: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009; 20(4):113-123.

Cho MI, Lin WL, Genco RJ. Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol*. 1995; 66: 522-530.

Colangelo P, Piatelli A, Barrucci S, Trisi P, Formisano G, Caiazza S. Bone regeneration guided by resorbable collagen membranes in rabbits. A pilot study. *Implant Dent* 1993; 2: 101-105.

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 Surg*. 2010; 125: 1685–1692.

Cordaro L, Amadè DS, Cordaro M. Clinical results of alveolar ridge augmentation with mandibular block bone grafts in partially edentulous patients prior to implant placement. *Clin Oral Implant Res* 2002; 13:103-111.

Cunha MJ, Esper LA, Sbrana MC, de Oliveira PG, do Valle AL, de Almeida AL. Effect of low-level laser on bone defects treated with bovine or autogenous bone grafts:in vivo study in rat calvaria. *Biomed Res Int* 2014; (2014):1-9. [ID 104230].

Cypher T, Grossman J. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 1996;35:413-417.

Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg* 1991b; 74: 487–491.

Dahlin C, Andersson L & Linde A. Bone augmentation at fenestrated implants by an osteopromotive membrane technique. A controlled clinical study. *Clin Oral Impl Res* 1991; 2: 159-169.

Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1990;24(1):13-9.

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

Dahlin C, Simion M, Nanmark U, Sennerby L. Histological morphology of the e-PTFE/tissue interface in humans subjected to guided bone regeneration in conjunction with oral implant treatment. *Clin Oral Implants Res*. 1998;9(2):100-6.

David R, Nissan M, Cohen I, Soudry M. Effect of low power He-Ne laser on fracture healing in rats. *Lasers in Surg Med* 1996; 19:458-464.

de Almeida AL, Medeiros IL, Cunha MJ, Sbrana MC, de Oliveira PG, Esper LA. The effect of low-level laser on bone healing in critical size defects treated with or without autogenous bone graft: an experimental study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res* 2014; 25(10): 1131-1136.

Diès F, Etienne D, Bou Abboud N, Ouhayoun JP. Bone regeneration in extraction sites after immediate placement of an e-PTFE membrane with or without a biomaterial. A report of 12 consecutive cases. *Clin Oral Implants Res* 1996; 7: 277–285.

Dodson TB (1997) Donor site morbidity. Diagnosis, treatment, prevention. In: Kaban, L.B., Pogrel, A.M. & Perrot, D.H., eds. *Complications in Oral and Maxillofacial Surgery*, 253–274. London: W.B. Saunders Co. Hjorting-Hansen E. Bone grafting to the jaws with special reference to reconstructive preprosthetic surgery. A historical review. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2002; 6: 6-14.

Donos N, Lang NP, Karoussis IK, Booshardt 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. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15:101-111.

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

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

Einhorn TA. Enhancement of fracture healing. *J Bone Jt Surg Am* 1995;77:940- 956.

Erziganli S, Kazancioglu HO, Mihmanli A, Sharifov R, Aydin MS. Effects of different biomaterials on augmented bone volume resorptions. *Clin Oral Implants Res*. 2014; [10111].

Esposito M, Grusovin MG, Whortington HV, Coulthard P. Interventions for replacing missing teeth: bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Aust Dent J* 2006; 51: 96–97.

Ezirganli S, Kazancioglu HO, Mihmanli A, Sharifov R, Aydin MS. Effects of different biomaterials on augmented bone volume resorptions. *Clin Oral Impl Res.* 2014; 1-7.

Ezirganli S, Polat S, Baris E, Tatar I, Celik HH. Comparative investigation of the effects of different materials used with a titanium barrier on new bone formation. *Clin Oral Implants Research* 2013;24: 312–319.

Fangel R, Bossini PS, Renno AC, Ribeiro DA, Wang CC, Toma RL, Nonaka KO, Driusso P, Parizotto NA, Oishi J. Low-level laser therapy, at 60 J/cm² associated with a Biosilicate(®) increase in bone deposition and indentation biomechanical properties of callus in osteopenic rats. *J Biomed Opt.* 2011;16(7): [10.1117].

Fávaro-Pipi EF, 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 2011; 29(5):311-317.

Fernandes KR, Ribeiro DA, Rodrigues NC, Tim C, Santos AA, Parizoto NA, Araújo HS, Driusso P, Rennó ACM. Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes related in the initial stages of bone defects in rats. *J Biomed Opt* 2013; 18(3) [101117].

Ferreira CE, Novaes AB, Haraszthy VI, Bittencourt M, Martinelli CB, Luczyszyn SM. A clinical study of 406 sinus augmentations with 100% anorganic bovine bone. *J Periodontol* 2009;80:1920-1927.

Findkcioglu K, Findkcioglu F, Yavuzer R, Elmas C, Ataby K. Effect of Platelet-Rich Plasma and Fibrin Glue on Healing of Critical-Size Calvarial Bone Defects. *J Craniofac Surg* 2009;20:34-40.

Fugazzotto PA. GBR using bovine bone matrix and resorbable and nonresorbable membranes. Part 1: Histologic results. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2003a; 23: 361-369.

Fugazzotto PA. GBR using bovine bone matrix and resorbable and nonresorbable membranes. Part 2: Clinical results. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003 b; 23: 599-605.

Galindo-Moreno P, Hernandez-Cortes P, Mesa F, Carranza N, Juodzbaly G, Aguilar M, O'Valle F. Slow resorption of anorganic bovine bone by osteoclasts in maxillary sinus augmentation. *Clin Implant Dent and Related Res* 2013; 15: 858–866.

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

Gerbi ME, Pinheiro AL, Marzola C, Limeira Júnior F de 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. *Photomed Laser Surg* 2005; 23(4):382-388.

Ghahroudi AAR, Rokn AR, Kalhori KAM, Khorsand A, Pournabi A, Pinheiro ALB, et al. Effect of low-level laser therapy irradiation and Bio-Oss graft material on the osteogenesis process in the rabbit calvarium defects: a double blind experimental study. *Lasers Med Sci.* 2014; 29: 925-932.

Gher ME, Quintero G, Sandifer JB, Tabacco M, Richardson AC. Combined dental implant and guided tissue regeneration therapy in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1994;14(4):332-47.

Giannobile WV, Hernandez RA, Finkelman RD, Ryan S, Kiristy CP, D'Andrea M, et al. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth-factor I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J Periodontal Res.* 1996; 31: 301-312.

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

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

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

Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe, J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 1984; 11: 494-503.

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. *Plast Reconstr Surg*. 2000;106(3):630-638; discussion 639.

Gross AJ, Jelkmann W (1990) Helium-neon laser irradiation inhibits the growth of kidney epithelial cells in culture. *Lasers Surg Med* 10:40–41.

Hallman M & Thor A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontol* 2000 2008; 47: 172-192.

Hallman M, Nordin T. Sinus floor augmentation with bovine hydroxyapatite mixed with fibrin glue and later placement of nonsubmerged implants: a retrospective study in 50 patients. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19: 222–227.

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

Hämmerle CH, Jung RE. Bone augmentation by means of barrier membranes *Periodontol* 2000. 2003;33:36-53.

Hammerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Impl Res* 1998; 3:151–162.

Hämmerle CHF, Lang NP. Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. *Clinical Oral Implants Res* 2001; 12: 9–18.

Hardwick R, Hayes BK, Flynn C. Devices for dento-alveolar regeneration: An up-to-date literature review. *J Periodontol*. 1995; 66:495-505.

Hockers T, Abensur D, Legrand R, Hammerle CHF. The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. *Clin Oral Implants Res*. 1999; 10:487-498.

Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*. 1990; 1: 60–68.

Hong L, Tabata Y, Miyamoto S, Yamada K, Aoyama I, Tamura M. Promoted bone healing at a rabbit skull gap between autologous bone fragment and the surrounding intact bone with biodegradable microspheres containing transforming growth factor-beta 1. *Tissue Eng* 2000; 6:331-340.

Honma T, Itagaki T, Nakamura M, Kamakura S, Takahashi I, Echigo S, Sasano Y. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral Diseases* 2008; 14: 457–464.

Houser, BE, Mellonig JT, Brunsvold MA, Cochran D, Meffert RM, Alder ME. Clinical evaluation of anorganic bovine bone xenograft with a bioabsorbable collagen barrier in the treatment of molar furcation defects. *International Journal of Periodontics and Restorative Dent* 2001; 21: 161–169.

Hurley LA, Stinchfield FE, Bassett AL, Lyon WH. The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. *J Bone Joint Surg Am.* 1959; 41:1243-1254.

Iezzi G, Scarano A, Mangano C, Cirotti B, Piattelli A (2008) Histologic results from a human implant retrieved due to fracture 5 years after insertion in a sinus augmented with an organic bovine bone. *J Periodontol* 79(1):192–198.

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

Jambhekar S, Kern F, Dent DrM, Bidra AS. Clinical and histologic outcomes of socket grafting after flapless tooth extraction: A systematic review of randomized controlled clinical trials. *J Prosthet Dent* 2015 [in press].

Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjørtting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11: 55–66.

Jensen SS, Brogini N, Hjørtting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(3):237-43.

Jensen SS, Terheyden H. Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: Clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;24:218–236.

Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Aberg P, Hirsch JM. Volumetry of simulated bone grafts in the edentulous maxilla by computed tomography: an experimental study. *Dentomaxillofac Radiol* 2001a; 30: 153–156.

Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Hirsch JM. A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. *Dentomaxillofac Radiol* 2001b; 30: 157–161.

Jordan HV. Rodent model systems in periodontal disease research. *J Dent Res* 1971; 50:236-242.

Jovanovic SA, Schenk RK, Orsini M, Kenney EB. Supracrestal bone formation around dental implants: An experimental dog study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995; 10:23-31.

Jovanovic SA, Spiekermann H & Richter EJ. Bone regeneration around titanium dental implants in dehiscence sites: a clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992; 7: 233-245.

Jung RE, Fenner N, Hämmerle CH, Zitzmann NU. Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24(10):1065-73.

Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration—animal and human studies. *Periodontol* 2000 1993; 1: 26–35.

Karu T. “Introduction,” in *The Science of Low-Power Laser Therapy*, T. I. Karu, Ed., pp. xiii–xviii, Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam (1998).

Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. “Cell attachment to extracellular matrices is modulated by pulsed radiation at 820 nm and chemicals that modify the activity of enzymes in the plasma membrane,” *Lasers Surg. Med*. 2001; 29(3):274–281.

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

Khadra M, Rønold HJ; Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haanaes HR. Low level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Impl Res*. 2004; 15(3):325-332.

Khan SN, Tomin E, Lane JM. Clinical applications of bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am* 2000;31(3):389—98.

Kitchen SS, Partridge CJ. “A review of low level laser therapy,” *Physiotherapy* 1991; 77(3), 161–168.

Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jonsson J. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg* 1992; 50: 241-249.

Klüppel E, Antonini F, Olate S, Nascimento FF, Albergaria-Barbosa JR, Mazzonetto R. Bone Repair is Influenced by Different Particle Sizes of Anorganic Bovine Bone Matrix: A Histologic and Radiographic Study In Vivo. *J Craniofac Surg* 2013; 24(4): 1074-1077.

Kostopoulos L & Karring T. Augmentation of the rat mandible using the principle of guided tissue regeneration. *Clin Oral Impl Res* 1994b; 5: 75-82.

Kostopoulos L & Karring T. Guided bone regeneration in mandibular defects in rats using a bioresorbable polymer. *Clin Oral Impl Res* 1994a; 5: 66-74.

Ladd AL, Plam NB. The role of bone graft and alternatives in unstable distal radius fracture treatment. *Orthop Clin North Am.* 2001;30:337–51.

Lang NP, Hämmeler CH, Bragger U, Lehmann B, Nyman SR. Guided tissue regeneration in jawbone defects prior to implant placement. *Clinical Oral Implants Res.* 1994; 5: 92–97.

Lewandrowski K, Gresser JD, Wise DL, Trantolo DJ. Bioresorb- able bone graft substitutes of different osteoconductivities: an histologic evaluation of osteointegration of poly (propylene glycol-co-fumaric acid) based cement implants in rats. *Biomaterials* 2000;21(8):757—64.

Linde A, Thoren C, Dahlin C, Sandberg E. Creation of new bone by an osteopromo- tive membrane technique: an experimental study in rats. *Int J of Oral and Maxillofac Surg* 1993; 51: 892–897.

Lindhe J, Cecchinato D, Donati M, Tomasi C, Liljenberg B. Ridge preservation with the use of deproteinized bone mineral. *Clin Oral Impl Res.* 2014; 25:786-790.

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

Lugar , Rockhind S, WollmanY, Kogan G, Dekel S. Effect of low power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers Surg Med* 1998; 22: 97–102.

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; 22:97-102.

Lundgren D, Nyman S, Mathisen T, Isaksson S, Klinge B. Guided bone regeneration of cranial defects, using biodegradable barriers: an experimental pilot study in the rabbit. *Journal of Craniomaxillofac Surg* 1992; 20: 257–260.

Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol*. 1991b; 62: 710-716.

Lynch SE, de Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, et al. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol*. 1991a; 62: 458-467.

Lysiak-Drwal K, Dominiak M, Solski L, Zywicka B, Pielka S, Konopka T, Gerber H. Early histological evaluation of bone defect healing with and without guided bone regeneration techniques: experimental animal studies. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2008; 11(62):282-288.

M, Bou Serhal C, Matni G, Naaman N. Healing patterns of critical size defects in rat following bone graft. *Oral Maxillofac Surg*. 2008; 12:73-78.

Machtei EE. The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: a meta-analysis. *J Periodontol*. 2001; 72(4):512-516.

Maiorana C, Beretta M, Grossi GB, Santoro F, Herford AS, Nagursky H, Cicciu M. Histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone coverage to reduce autogenous grafts resorption: Preliminary results. *Open Dent J*. 2011; 5:71-78.

Maiorana C, Beretta M, Salina S, Santoro F. Reduction of autogenous bone graft resorption by means of Bio-Oss coverage: a prospective study. *Int J Period Rest Dent* 2005; 1:19-25.

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

Mardas N, Stavropoulos A, Karring T. Calvarial bone regeneration by a combination of natural anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix coupled with a synthetic cell-binding peptide (PepGen TM): an experimental study in rats. *Clin Oral Implant Res*. 2008; 19: 1010–1015.

Mardas, N, Kostopoulos L, Karring T. Bone and suture regeneration by e-PTFE membranes and demineralized bone matrix and the impact on calvarial growth. *J Craniofac Surg* 2002; 13: 453–462.

Martinez MEM, Pinheiro ALB, Ramalho LMP. Effect of IR photobiomodulation on the repair of bone defects grafted with organic bovine bone. *Lasers Med Sci*. 2008; 23:313–317.

Matsumoto MA, Ferino, FV, Monteleone GF, Ribeiro DA. Low level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. *Lasers Med. Sci*. 2009; 24:196–201.

McAllister BS, Haghighat S. Bone augmentation techniques. *J Periodontol*. 2007; 78:377–396.

McAllister BS, Haghighat S. Bone augmentation techniques. *J Periodontol*. 2007;78:377–396.

Melo LG, Nagata MJ, Bosco AF, Ribeiro LL, Leite CM. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. A histological and histometric study in rat tibias. *Clin Oral Implants Res*. 2005; 16:683–691.

Merli LAS, Santos MT, Genovese WJ, Faloppa F. Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. *Photomed Laser Surg* 2005; 23(2):212–215.

Messora MR, Nagata MJ, Dornelles RC, Bomfim SR, Furlaneto FA, de Melo LG, Deliberador TM, Bosco AF, Garcia VG, Fucini SE. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodont Res* 2008; 43:723–729.

Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JB. Effect of laser rays on wound healing. *Am. J. Surg*. 1971; 122:532–535.

Minabe M. A critical review of the biologic rationale for guided tissue regeneration. *J Periodontol.* 1991; 62(3):171-179.

Molly L, Quirynen M, Michiels K, van Steenberghe D. Comparison between jaw bone augmentation by means of a stiff occlusive titanium membrane or an autologous hip graft: a retrospective clinical assessment. *Clinical Oral Implants Research* 2006;17(5):481–7.

Moses O, Vitrial D, Aboodi G, Sculean A, Tal H, Kozlovsky A, Artzi Z, Weinreb M, Nemcovsky CE. Biodegradation of three different collagen membranes in the rat calvarium: a comparative study. *J Periodontol.* 2008; 79(5):905-911.

Muschler GF, Negami S, Hyodo A, et al. Evaluation of collagen ceramic composite graft materials in a spinal fusion model. *Clin Orthop* 1996;328:250- 260.

Nery EB, Lynch KL, Rooney GE. Alveolar ridge augmentation with tricalcium phosphate ceramic. *J Prosthet Dent* 1978; 40: 668–675.

Nevins M, Camelo M, De Angelis N, Hanratty JJ, Kwon JJ, Rasperini G, Rocchietta I, Schupbach P, Kim DM. The Clinical and Histologic Efficacy of Xenograft Granules for Maxillary Sinus Floor Augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2011; 31:227-235.

Nicolau, A. R. et al. Effect of low-power GaAlAs laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med. Sci.* 2003; 18: 89-84.

Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Troger M, Kloss F, Neukam FW. Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2001; 12: 495– 502.

Nowzari H, Matian F, Slots J. Periodontal pathogens on polytetrafluoroethylene membrane for guided tissue regeneration inhibit healing. *J Clin Periodontol.* 1995; 22(6):469-474.

Nyman et al., 1990; Wilson & Buser, 1994; von Arx, 1994; Shanaman, 1994; Saadoun & Le Gall, 1994; Rominger & Triplett, 1994; Nevins & Mellonig, 1994.

Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1982; 9: 290–296.

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

Owens KW, Yukna RA. Collagen membrane resorption in dogs: A comparative study. *Implant Dent* 2001; 10:48-58.

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

Ozdemir H, Erziganli S, Kara MI, Mihmanli A, Baris E. Effects of platelet rich fibrin alone used with rigid titanium barrier. *Arch of Oral Biol* 2013; 58: 537-544.

Ozmeric N, Bal B, Oygur T, Balos K. The effect of a collagen membrane in regenerative therapy of two-wall intrabony defects in dogs. *Periodontal Clin Invest* 2000; 22: 22–30.

Ozmeric N, Bal B, Oygur T, Balos K. The effect of a collagen membrane in regenerative therapy of two-wall intrabony defects in dogs. *Periodontal Clin Invest* 2000; 22: 22–30.

Park SH, Lee KW, Oh TJ, Misch CE, Shotwell J, Wang HL. Effect of absorbable membranes on sandwich bone augmentation. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(1):32-41.

Passarella S; Casamassima E; Molinari S et al. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *FEBS Lett* 1984; 175: 95-99.

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

Pihlstrom BL, McHugh RB, Ouphant TH, Ortiz-Campos C. Comparison of surgical and nonsurgical treatment of periodontal disease. A review of current studies and additional results after 6 1/2 years, *J of Clin Periodontol*. 1983; 10:514-541.

Pietrokovski J, Massler M. Alveolar ridge resorption following tooth extraction. *J Prosthet Dent* 1967;17:21–27.

Pietrokovski J, Starinsky R, Arensburg B, Kaffe I. Morphologic characteristics of bony edentulous jaws. *J Prosthodont* 2007; 16(2): 141-147.

Pinheiro AL, Aciole GT, Ramos TA, Gonzalez TA, da Silva LN, Soares LG, et al. The efficacy of the use of IR laser phototherapy associated to biphasic ceramic graft and guided bone regeneration on surgical fractures treated with miniplates: a histological and histomorphometric study on rabbits. *Lasers Med Sci*. 2014;29(1):279-88.

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

Pinheiro AL, Limira FA Jr, Gerbi ME, Ramalho LM, Marzola C, Ponzi EA. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone, *Braz Dent J* 2003; 14(3): 177-181.

Pinheiro AL, Limeira FA Jr, Gerbi ME, Ramalho LM, Marzola C, Ponzi EA, et al. Effect of 830 nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. *J Clin Laser Med Surg* 2003;21(5):301-306.

Pinholt EM, Bang G, Haanases HR. Alveolar ridge augmentation in rats by Bio-Oss. *Scand J Dent Res.* 1991;99(2):154-61.

Polimeni G, Koo K-T, Qahash M, Xiropaidis AV, Albandar, JM, Wikesjö, UME: Prognostic factors for alveolar regeneration: effect of a space-providing biomaterial on guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 725–729.

Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S, Limlertmongkrol S. Osteoconductive effect of 3-heat treated hydroxyapatite in rabbit calvarial defects. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65:2418-2424.

Rejda BV, Peelen JG, De Groot K. Tri- calcium phosphate as a bone substitute. *J. Bioengineering* 1977; 1: 93–97.

Renno ACM, McDonnell PA, Laakso L. “Effect of 830 nm laser phototherapy on osteoblasts grown in vitro on Biosilicate scaffolds. *Photomed. Laser Surg.* 2010; 28(1), 131–133.

Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21:567-576.

Richardson CR, Mellonig JT, Brunsvold MA, McDonnell HT, ■Cochran DL Clinical evaluation of Bio-Oss®: a bovine- derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Clin Periodontol.*1999; 26:421–428.

Rosa AP, Sousa LG, Regalo SCH, Issa JPM, Barbosa APA, Pitol DL, et al. Effects of the combination of low-level laser irradiation and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bone repair. *Lasers Med Sci* (2012) 27:971–977.

Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Hertel M, Scherbaum W, Becker J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Implants Res*. 2004; 15(4):443-449.

Ruedi TP, Bassett CA. Repair and remodeling in Millipore-isolated defects in cortical bone. *Acta Anat* 1967; 68:509-531.

Saracino S, Mozzati M, Martinasso G, Pol R, Canuto RA, Muzio G. Superpulsed laser irradiation increases osteoblast activity via modulation of bone morphogenetic factors. *Lasers Surg Med*. 2009;41(4):298-304.

Sattayut S, Hughes F, Bradley P. 820 nm gallium aluminium arsenide laser modulation of prostaglandin E2 production in interleukin-1 stimulated myoblasts. *Laser Therapy* 1999; 11:88-95.

Sauer HD, Schoettle H. The stability of osteosyntheses bridging defects. *Arch Orthop Trauma Surg* 1979;95:27-30.

Saygun, I. et al. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2008; 23: 211-215.

Schelegel AK; Möhler H; Busch F; Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). *Biomaterials* 1997; 18: 535-538.

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

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

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

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

Schlickewei W, Riede UN, Yu J, Ziechmann W, Kuner EH, Seubert B. Influence of humate on calcium hydroxyapatite implants. *Arch Orthop Trauma Surg* 1993;112:275-279.

Schliephake H, Kage T. Enhancement of bone regeneration using resorbable ceramics and a polymer-ceramic composite material. *J Biomed Mater Res*. 2001; 56(1):128-36.

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

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

Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone Healing and Soft Tissue Contour Changes Following Single-Tooth Extraction: A Clinical and Radiographic 12-Month Prospective Study. *Int J Period Res Dent*. 2003; 23: 313-323.

Selvig KA, Kersten BG, Chamberlain AD, Wikesjo UM, Nilveus RE. Regenerative surgery of intrabony periodontal defects using ePTFE barrier membranes: scanning electron microscopic evaluation of retrieved membranes vs. clinical healing, *J Periodontol*. 1992; 63: 974-978.

Selvig KA, Kersten BG, Chamberlain, AD, Wikesjo UM, Nilveus RE. Regenerative surgery of intrabony periodontal defects using ePTFE barrier membranes: scanning electron microscopic evaluation of retrieved membranes vs. clinical healing, *J Periodontol* 1992; 63: 974-978.

Sevor JJ, Meffert RM, Cassingham RJ. Regeneration of dehisced alveolar bone adjacent to endosseous dental implants utilizing a resorbable collagen membrane. Clinical and histologic results. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1993; 13:71-83.

Shakouri SK, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci* 2010; 25: 73-77.
Shi et al., 1996.

Sigurdsson, T. J. et al. Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodontol* 1995; 66: 131-138.

Silva RV, Camilli JA. Experimental Sutdy. Repair of bone defects treated wih autogenous bone graft and low-power laser. *J Craniofac Surg* 2006; 2: 297-301.

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

Simion M, Dahlin C, Blair K, Schenk RK. Effect of different microstructures of e-PTFE membranes on bone regeneration and soft tissue response: a histologic study in canine mandible. *Clinical Oral Implants Res* 1999; 10: 73–84.

Simion M, Jovanovic SA, Trisi P, Scarano A, Piattelli A. Vertical ridge augmentation around dental implants using a membrane technique and autogenous bone or allografts in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1998;18(1):8-23.

Springer IN, Terheyden H, Geiss S, Harle F, Hedderich J, Acil Y. Particulated bone grafts—effectiveness of bone cell supply. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15: 205-212.

Stavropoulos A; Kostopoulos L; Nyengaard JR, Karring T. Deproteinized bovine bone (Bio-Oss) and bioactive glass (Biogran) arrest bone formation when used as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR): an experimental study in the rat. *J Clin Periodontol* 2003; 30(7):636-643.

Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg* 2005; 23:161-166.

Stein MD, Salkin LM, Freedman AL, Glushko V. Collagen sponge as a topical hemostatic agent in mucogingival surgery. *J Periodontol.* 1985;56(1):35-38.

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. *J Craniomaxillofac Surg.* 2001;29(5):282-8.

Tajali SB, Macdermid JC, Houghton P, Grewal R. Effects of Low Power Laser Irradiation on Bone Healing in Animals: A Meta-Analysis. *J Orthop Surg and Res.* 2010; 5:1-10.

Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, Lopez-Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between bio-oss and a novel beta-tcp/dcpd granulate. *J Clin Periodontol.* 2006; 33:922–928.

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

Tempo PI, Nalhandian J. Colonization of retrieved polytetrafluoroethylene membranes: morphological and microbiological observations. *J Periodontol* 1993; 64: 162-168.

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

Thorwarth M, Schlegel KA, Wehrhan F, Srouf S, Schultze-Mosgau S. Acceleration of de novo formation following application of autogenous bone to particulated anorganic bovine material in vivo. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:309-16.

Torres J, Tamimi FM, Tresguerres IF, Alkhraisat MH, Khraisat A, Lopez-Cabarcos E, Blanco L. Effect of solely applied platelet-rich plasma on osseous regeneration compared to bio-oss®: A morphometric and densitometric study on rabbit calvaria. *Clin Implant Relat Res* 2008; 10: 106-112.

Traini T, Valentini P, Iezzi G, Piattelli A. A histologic and histomorphometric evaluation of norganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. *J Periodontol* 2007; 78:955-961.

Trelles MA, Mayayo E: Bone fracture consolidate faster with low power laser. *Lasers Surg Med.* 1987; 7(1):36-45.

Tresguerres IF, Clemente C, Donado M et al. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13: 631-636.

Trombelli L, Heitz-Mayfield L, Needleman I, Moles D, Scabbia A. A systematic review of graft materials and biological agents for periodontal intraosseous defects. *J of Clin Periodontol* 2002; 29: 117–135.

Turri A, Dahlin C. Comparative maxillary bone-defect healing by calcium-sulphate or deproteinized bovine bone particles and extra cellular matrix membranes in a guided bone regeneration setting: an experimental study in rabbits. *Clin. Oral Implant Res.* 2014; 1–6 [10111].

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965: 150: 893–899.

Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25(8): 879-893.

Valentini P, Abensur D, Wenz B, Peetz M, Schenk R. Sinus grafting with porous bone mineral (Bio-Oss) for implant placement: a 5-year study on 15 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000; 20: 245–253.

Valiati R, Paes JV, Moraes AN, Gava A, Agostini M, Masiero AV, et al. Effect of low level laser therapy incorporation of block allografts. *Int J Med Sci* 2012; 9(10):853-861.

Van Heest A, Swiontowski M. Bone-graft substitutes. *Lancet* 1999;353 (1):28—9.

Von Arx T, Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. *Clin Oral Impl Res.* 2006; 17:359-366.

Von Arx T, Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Buser D. Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. A histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. *Clin Oral Impl Res* 2001; 12(3): 260-269.

Wallace SS, Froum SJ, Cho SC et al. Sinus augmentation utilizing anorganic bovine bone (Bio-Oss) with absorbable and non-absorbable membranes placed over the lateral window: Histomorphometric and clinical analyses. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2005; 25: 551-559.

Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part I. Soft tissue applications. *Aust Dent J* 1997;42:247-254.

Wang HL, Misch C, Neiva RF. "Sandwich" bone augmentation technique: rationale and report of pilot cases. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2004;24(3):232-45.

Weingart D; Petrin G. Maxillofacial applications of implants in conjunction with bone grafts. In: Lang NP, Karring T & Lindhe J., eds. *Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology – Implant Dentistry*, 544-556. Berlin: Quintessence Publishing Co. Inc. 1999.

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: 1599-1606.

Wetzel AC, Stich H, Caffesse RG. Bone apposition onto oral implants in the sinus area filled with different grafting materials. A histological study in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* 1995; 6: 155-163.

Widmark G, Andersson B, Ivanoff, C.-J. Mandibular bone graft in the anterior maxilla for single-tooth implants. Presentation of a surgical method. *Int J of Oral and Maxillofac Surg* 1997; 26:106–109.

Wikesjö UM, Razi SS, Sigurdsson, TJ, Tatakis DN, Lee MB, Ongpipattanakul B. Periodontal repair in dogs: effect of recombinant human transforming growth factor-beta1 on guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*. 1998; 25: 475-481.

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. *Calc Tiss Intl* 1996; 59:297-300.

Zaner DJ, Yukna RA. Particle size of periodontal bone grafting materials. *J Periodontol* 1984;55:406-409.

Zellin G, Gritli-Linde A, Linde A. Healing of mandibular defects with different biodegradable and non-biodegradable membranes: an experimental study in rats. *Biomaterials* 1995;16:601-609.

Zitzmann NU, Naef R, Schärer P. Resorbable versus non-resorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997; 12:844-852.

Zitzmann NU, Schaerer P, Marinello CP. Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study. *Int J of Oral & Maxillofac Implants* 2001; 16: 355–366.

Anexos

ANEXO

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 002/2012

Bauru, 27 de março de 2012.

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 regeneração óssea guiada e enxertos de origem bovina associados ou não ao laser de baixa intensidade. Estudo histológico e histométrico**, de autoria de Luis Augusto Esper, sob sua orientação foi enviado ao relator para avaliação e considerado APROVADO em reunião desta Comissão realizada no dia **26 de março de 2012**.

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