UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MICHYELE CRISTHIANE SBRANA

**Avaliação de diferentes protocolos de aplicação do laser de baixa
intensidade associado ou não ao osso bovino inorgânico (Bio-Oss[®]) na
cicatrização de defeitos ósseos criados cirurgicamente em calvárias de ratos.
Estudo histológico e histométrico**

BAURU
2015

MICHYELE CRISTHIANE SBRANA

Avaliação de diferentes protocolos de aplicação do laser de baixa intensidade associado ou não ao osso bovino inorgânico (Bio-Oss[®]) na cicatrização de defeitos ósseos criados cirurgicamente em calvárias de ratos.
Estudo histológico e histométrico

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração: Reabilitação Oral.

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

BAURU
2015

Sbrana, Michyele Cristhiane Sbrana

Sb62a Avaliação de diferentes protocolos de aplicação do laser de baixa intensidade associado ou não ao osso bovino inorgânico (Bio-Oss®) na cicatrização de defeitos ósseos criados cirurgicamente em calvárias de ratos. Estudo histológico e histométrico../ Michyele Cristhiane Sbrana. Bauru, 2015.
131 p. : il. ; 30 cm.

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

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

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 038/2013
Data: 21/10/2013

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

À Deus,

Pela vida, por ter me dado uma família maravilhosa., Por ter me dado um marido maravilhoso, compreensivo, companheiro e amigo. Por ter me dado saúde, disposição e coragem, por ter me protegido nas minhas idas e vindas, por ter me iluminado e me dado inspiração. Por abrir minhas portas e permitir que eu atingisse meus objetivos e sonhos. Por ter me dado a oportunidade de conhecer e trabalhar com pessoas incríveis.

“Deus está sempre à nossa volta, nas coisas que nem imaginamos.”

Aos meus pais, Rodney e Beatriz

Muito obrigada por me amarem tanto, me compreenderem, me esperarem. Por ter me gerado, educado e ensinado os princípios que trago comigo. Os seus exemplos fizeram com que eu conseguisse alcançar meus sonhos, meus objetivos e mais esta vitória da minha carreira. Vocês são o meu porto seguro, meu refúgio, minha inspiração. Dignidade absoluta, otimismo, humildade e dedicação suprema encontrei em vocês. Muito obrigada por terem me ensinado os verdadeiros valores de nossas vidas. Que privilégio e orgulho ter vocês como meus pais. A vocês, minha admiração, respeito e gratidão infinitos... Amo vocês!

Aos meus Avós, Mário e Clélia, Margo e Ledi

O equilíbrio de toda a nossa família! Obrigada por terem acreditado nos meus sonhos comigo. Obrigada pelo incentivo, pelas orações valiosas, pelo amor. Vocês são exemplos de amor, serenidade, resignação, humildade, honestidade, fé, otimismo e esperança. Nada nos separou e nada nos separará. Nem a morte e nem a vida... Porque estamos unidos em um plano divinamente atemporal”.

Às minhas irmãs Danielle e Francielle

Pessoas maravilhosas... Riquezas da minha vida, pelas virtudes que carregam dentro de si, pela indefinível sensação de que existe perfeição quando penso em vocês, sempre presentes no meu coração e no meu pensamento. Obrigada pelo apoio, pelo carinho, pela compreensão, pela grande amizade, e pelo privilégio de poder desfrutar desta riqueza maior!

Aos meus cunhados e irmãos de coração **Teruo e Maurício**

Por todo apoio e todo carinho que sempre demonstraram e pelos momentos agradáveis que sempre compartilhamos quando estamos reunidos.

Aos meus sobrinhos **Luany, Amélia, Clara, Pedro Henrique, Victor Hugo, Murilo e Yan**

Anjos em minha vida... Obrigada por iluminar os meus dias. Vocês chegaram a nossas vidas e as transformaram, são motivos de alegria, de fé, de esperança, motivação. Obrigada por iluminar cada dia de minha vida com seus preciosos sorrisos. Obrigada pelos abraços sinceros. Gratidão infinita pelo amor imensurável que tenho por vocês!

Ao meu, e melhor, marido **Luis Augusto**

Meu maior tesouro. Impossível traduzir o amor que sinto por você em poucas palavras. É muito bom te amar e ter você em meu coração, é muito bom poder contar com você nos momentos difíceis, fáceis, alegres e tristes, é muito bom ter sempre o seu apoio na vida pessoal e profissional, é muito bom ter sempre sua compreensão, seu incentivo e sua confiança. Choramos juntos, rimos juntos, batalhamos juntos, crescemos juntos... Identificamo-nos um com o outro, respeitamos as nossas diferenças e enxergamos no outro suas mais valiosas qualidades... Tornamo-nos um casal unido, amigo, companheiro e acima de tudo muito feliz! Você é fundamental e essencial em minha vida. Obrigada pela ajuda incansável e incentivo nas pesquisas, projetos, aulas, e em tudo na vida... Muito obrigada por acreditar em mim. Muito obrigada pelo seu amor, por cuidar tanto de mim.

Amo Você!

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha querida orientadora

Profa Dra Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida

Um privilégio ter você como minha orientadora, professora e amiga. Uma mulher guerreira, competente, justa e com um coração enorme. Uma respeitada professora, exalando a docência e despertando novas vocações. Aprendi com você muito além da Periodontia... Você me ensinou o que de mais nobre existe no ser humano, me fez acreditar que um dia eu poderia ser um grande profissional, e acima de tudo uma grande pessoa. Serei eternamente grata por todos seus ensinamentos, pela sua atenção, pelo seu carinho. São exemplos que serão levados por uma vida inteira. Uma amiga verdadeira, capaz de enriquecer a alma de quem está próximo. Sentir sua amizade, sentir o carinho, sentir o respeito na sua totalidade é um presente valioso de Deus. E hoje posso dizer que tenho essa riqueza, pois tenho você como amiga...Você é muito importante na minha vida pessoal e profissional!

Muito obrigada por fazer parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

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

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 valiosa contribuição na minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro obrigada pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência em sempre ajudar. Pelo exemplo de dignidade, simplicidade, humildade, de educador, pesquisador, profissional ético.

Ao Prof. Dr. Accácio Lins do Valle pelos ensinamentos transmitidos, pela atenção e forma amigável como sempre me tratou. Pelo exemplo de simplicidade e humildade. Por todo carinho e amizade.

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. Karin 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 durante esse tempo.

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 Luís Scombatti de Souza e Dra. Adriana Maria Mariano Silveira e Souza, por permitir que trabalhássemos juntos, por todo conhecimento transmitido, pela agradável convivência. Pelo apoio que nos deu no desenvolvimento deste trabalho e por intermediar nosso contato com o Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Grandes profissionais, pessoas admiráveis.

À Vani Maria Alves, técnica do Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela contribuição, em parte, no processamento laboratorial deste trabalho.

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, em parte, 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 , pelo esforço em ajudar 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.

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, pela acolhida, em especial aos professores Fernando Orosco, Thiago Pegoraro, Debora Milreu, Ana Claudia Conti, Karin Modena, Vivian Biella Passos, Guilherme da Silva, Joel Santiago Junior, Flora Tavora, Pâmela dos Santos, Regina Guedes de Azevedo, Marcos Curi, Carolina Pegoraro, Marcela Calabria, Valdey Suedam, Roberto Kawakami, José Fernando Scareli Lopes, João Henrique Nogueira pelo convívio amigável.

Aos docentes da Periodontia da Universidade Sagrado Coração Beatriz Maria Valério Lopes, Élcia Maria Silveira, Mirella Lindoso, Luis Augusto Esper, Patrícia Pinto Saraiva pelo convívio sempre amigável e respeitoso. Por todos os momentos que compartilhamos.

À Profa. Bella Luna Colombini Ishikiriama por toda ajuda e pela sua amizade.

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

Aos colegas do mestrado e doutorado da área de Reabilitação Oral, os dons são vários, mas a vocação é única. Nas experiências vividas, fica a certeza de que o respeito e a partilha são os melhores atalhos para atingirmos nossos objetivos.

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

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

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

Aos amigos Edson Zen e Michelly Lima, pelas risadas, pelas boas conversas, pela valiosa amizade.

Aos amigos do Pilates, em especial a Erika Nalli, por fazer o meu dia mais leve, pelas boas risadas, pelas boas conversas, pela valiosa amizade.

Aos amigos Mariana e Vinícius, pelas boas e longas conversas, pela valiosa amizade.

Ao Instituto de Ensino Odontológico (IEO) pela acolhida e oportunidade de trabalho. Aos “personagens” do IEO, Karyna Corotti, Mauro, Caio, Vivian, Letícia, Karoline, Carolina Ortigosa, Karin, Cintia, Maria, Edson agradeço pelo convívio harmonioso, pelas experiências vividas, pelo apoio e incentivo que sempre me deram. Por todas as alegrias e dificuldades compartilhadas. Pela amizade.

Ao Centrinho (Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais de Bauru – HRAC-USP), à diretoria, seus profissionais, funcionários, amigos de turma e pacientes pelo imensurável engrandecimento profissional e pessoal que me proporcionaram. Conheci e aprendi a respeitar o notável trabalho realizado por todos nesta instituição... Minha eterna gratidão...

A MINHA SINCERA GRATIDÃO. . .

Às pessoas especiais que moram em meu coração:

À minha querida sogra Rosa Henn

Pessoa especial que me presenteou com meu maior tesouro. Obrigada pelo apoio e pelas palavras de incentivo em todos os momentos. Pelo carinho que sempre teve por mim, por me deixar fazer parte dessa família. Tenho grande admiração pela senhora, pelo exemplo de dignidade, serenidade e praticidade com que leva a vida. Que Deus te conserve assim, essa pessoa tão generosa. Muito obrigada por tudo e por ser esta pessoa maravilhosa.

Aos meus cunhados e irmãos de coração Stella, Victor, Andrea e Alfredo

Pelos momentos alegres, pelas risadas, pelos abraços carinhosos, pela acolhida, pelo incentivo, pelo amor e pela adorável convivência.

Aos meus queridos tios e padrinhos Miriam e Fernando Ribeiro

Pela companhia sempre agradável, e por todo carinho que sempre demonstraram. Fico muito feliz em ter vocês por perto.

Às minhas queridas amigas Cintia, Karin, Karoline e amigos Marcelo e Marquinhos

É bom saber que temos amigos em quem podemos confiar. Pessoas que nos apoiam e nos acolhem com tanto carinho. Obrigada pelos sorrisos e lágrimas, pela compreensão e companhia em todos os momentos. Tenho um carinho enorme por vocês... Obrigada pela amizade. “É na amizade verdadeira que encontramos sinceridade, lealdade, afinidade, cumplicidade, simplicidade, fraternidade.”

Aos meus queridos amigos Paula Pessoa, Mércia Cunha, Paula Karine Jorge, Natália Campos, Ana Laura P. Ranieri, Ingrid e Jefferson, Ludmila e Samuel

Pouco importa saber em que parte do mundo nossos amigos se encontram se podemos sentir na alma que dentro de nós e dentro deles há um espaço reservado que nada mais poderá preencher. Obrigada pelo incentivo e amor que, mesmo com a distância, fazem-se vivos em meus dias. Tenho um carinho enorme por vocês... Obrigada pela amizade.

Aos meus Familiares

Base na qual me apoio diante das dificuldades. Obrigada pela torcida. Amo minha família, cada um de vocês. Mesmo distantes, conseguimos manter a chama desse amor. O amor que nos une a cada dia, dando-nos força para viver, dando-nos força a cada caminhada, pois onde quer que vamos, sabemos que jamais estamos sozinhos. Os caminhos são diferentes, mas quando precisamos ali estamos nós, em qualquer situação, acolhendo uns aos outros, semeando o amor de Deus, e o amor de nossos pais.

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

Muito obrigada!

“Ser feliz não é ter uma vida perfeita
Mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância
Usar as perdas para refinar a paciência
Usar as falhas para esculpir a serenidade
Usar a dor para lapidar o prazer
Usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência...”

(Augusto Cury)

RESUMO

RESUMO

O propósito deste estudo foi avaliar diferentes protocolos de aplicação do laser de baixa intensidade (LBI) associados ou não ao osso bovino inorgânico (Bio-Oss®) na cicatrização de defeitos ósseos de tamanho crítico (DTC) em calvárias de ratos. Foram utilizados 90 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar). Um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5 mm de diâmetro foi criado cirurgicamente na calvária de cada animal. Os animais foram divididos igualmente (n=10) e aleatoriamente em 9 grupos experimentais: 1) grupo C (controle), 2) grupo LBI (4J) (laser de baixa intensidade – GaAlAs, 730 nm, 100 mW, 4J, 140 J/cm²), 3) Grupo LBI (6J) (laser de baixa intensidade – GaAlAs, 730 nm, 100 mW, 6J, 210 J/cm²), 4) Grupo BO (osso bovino inorgânico), 5) Grupo BO + LBI (4J) (osso bovino inorgânico + laser de baixa intensidade 4J), 6) Grupo BO + LBI (6J) (osso bovino inorgânico + laser de baixa intensidade 6J), 7) Grupo OA (osso autógeno), 8) Grupo OA + LBI (4J) (osso autógeno + laser de baixa intensidade 4J), 9) Grupo OA + LBI (6J) (osso autógeno + laser de baixa intensidade 6J). Os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias pós-operatórios. Foram avaliadas a área de osso neoformado (AON), extensão linear de osso (ELO) e área de partículas remanescentes (APR). Os dados foram submetidos ao teste paramétrico ANOVA, seguido pelo teste de Tukey (p<0,05). O grupo BO+LBI (6J) demonstrou maior média (48,57 ± 28,22%) de AON e o grupo C a menor média (9,96 ± 4,49%) de AON. Os grupos LBI (6J), OA+LBI (6J) e BO+LBI (6J) demonstraram diferenças estatisticamente significativas de AON em relação ao grupo C. Em relação a ELO, apenas os grupos BO e BO+LBI (4J) não demonstraram diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao grupo C, e a maior diferença entre as médias de ELO foram nas comparações do grupo LBI (6J) (76,55 ± 15,54%) com o grupo C (16,00 ± 9,86%). Maior APR foi observada nos grupos em que BO não foi irradiado pelo LBI. Porém, quando comparado o Grupo BO+LBI (6J) aos grupos OA+LBI (4J) e BO+LBI (4J) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. O protocolo do LBI (6J) promoveu maior formação óssea quando utilizado isoladamente ou associado ao BO, tornando-se uma opção vantajosa para ser utilizado no tratamento de defeitos ósseos.

Palavras chave: Lasers. Ratos. Regeneração.

ABSTRACT

ABSTRACT

Evaluation of different protocols of low-level laser (LLL) application combined or not with inorganic bovine bone (Bio-Oss[®]) in the healing of surgically created bone defects in rat calvaria. Histological and histometric study

The purpose of this study was to evaluate different protocols of low-level laser (LLL) application combined or not with inorganic bovine bone (Bio-Oss[®]) in the healing process of bone defects of critical size (CSD) in rat calvaria. 90 male adult rats (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar) were used. A critical size defect (CSD) of 5 mm in diameter was surgically created in the calvaria of each rat. The rats were then divided equally (n=10) and randomly into 9 experimental groups: 1) Group C (control) 2) Group LBI (4J) (low-level laser - GaAlAs, 730 nm, 100 mW, 4J, 140 J/cm²), 3) Group LBI (6J) (low-level laser - GaAlAs, 730 nm, 100 mW, 6J, 210 J/cm²), 4) Group BO (inorganic bovine bone), 5) Group BO + LBI (4J) (inorganic bovine bone + low-level laser 4J), 6) Group BO LBI (6J) (inorganic bovine bone + low-level laser 6J), 7) Group OA (autogenous bone), 8) Group OA + LBI (4J) (autogenous bone + low-level laser 4J), 9 Group OA + LBI (6J) (autogenous bone + low-level laser 6J). The rats utilized were euthanized 30 days post-operation. The areas of new bone formation (ANB), linear extension bone (LEB), and areas of remaining particles (ARP) were evaluated. The data underwent the parametric ANOVA test, followed by the Tukey test (p<0,05). Group BO+LBI (6J) presented the greatest average (48,57 ± 28,22%) of ANB and Group C presented the lowest average (9,96 ± 4,49%) of ANB. The groups LBI (6J), OA+LBI (6J), and BO+LBI (6J) presented statistically significant differences of ANB in comparison to Group C. Regarding the LEB, only the groups BO and BO+LBI (4J) did not present differences statistically significant in comparison to Group C. The largest difference between the averages of LEB were in the comparison of Group LBI (6J) (76,55 ± 15,54%) with Group C (16,00 ± 9,86%). The largest ARP was observed in the groups where the inorganic bovine bone was not irradiated by the LLL. However, when comparing Group BO+LBI (6J) to Group OA+LBI (4J) and BO+LBI (4J), no statistically significant differences were noted. The protocols of LLL (6J) promoted greater bone formation when used alone or combined with the inorganic bovine bone, making it an advantageous option for treating bone defects.

Keywords: Laser, Rats, Regeneration

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Após incisão semi-lunar, retalho total deslocado em direção posterior.	50
Figura 2	- Broca Trefina (5mm) em posição na região em que foi realizado o DTC.....	51
Figura 3	- Guia cirúrgico em posição para realização do DTC.	51
Figura 4	- Defeito cirúrgico confeccionado, com preservação da dura-máter e via encefálica.	52
Figura 5	- Marcações em “L” 2 mm anterior e 2 mm posterior às margens do DTC preenchidas com amálgama.	53
Figura 6	- Esquema dos pontos de aplicação do LBI.	55
Figura 7	- Espécime dividido longitudinalmente em dois blocos após a descalcificação, ao longo do centro do defeito cirúrgico original, utilizando as marcações em “L” como referência.....	56
Figura 8	- Delimitação do defeito cirúrgico original, da área total do defeito (AT), da área de osso neoformado (AON) e da área de partículas remanescentes (APR) de BO.	57
Figura 9	- Medidas de extensão linear do defeito (ELD) e extensão linear de novo osso (ELO).....	57
Figura 10	- Fotomicrografia dos grupos (A) Controle, (B) Bio-Oss® e (C) Osso Autógeno. Visão panorâmica do defeito cirúrgico. Diferença na extensão de novo osso formado entre os diversos grupos de tratamento. 4x, H.E.	63
Figura 11	- Fotomicrografia dos grupos (A) LBI (4J), (B) LBI (6J), (C) BO + LBI (4J), (D) BO + LBI (6J), (E) OA + LBI (4J) e OA + LBI (6J). Visão panorâmica do defeito cirúrgico. Diferença na extensão de novo osso formado entre os diversos grupos de tratamento. 4x, H.E. cirúrgico original. 10x, H.E. B) Fibras colágenas paralelas preenchendo a maior extensão do defeito cirúrgico criado. 20x, T.M.....	65
Figura 12	- A) Fotomicrografia do grupo C. Extensão de osso neoformado apenas nas extremidades do defeito	67

Figura 13	- Fotomicrografia do grupo BO. O defeito preenchido quase na sua totalidade por partículas de BO. Tecido conjuntivo fibroso organizado e envolvendo as partículas de BO. 20x, H.E.....	69
Figura 14	- Fotomicrografia do grupo BO. Osso neoformado apenas nas extremidades do defeito. Não ocorreu fechamento do defeito cirúrgico com novo osso, porém a espessura da calvária foi restabelecida em todos os espécimes. 10x, H.E.....	71
Figura 15	- Fotomicrografia do grupo OA. Tecido conjuntivo organizado preenchendo o defeito cirúrgico, e pouca quantidade partículas remanescentes de OA nos espécimes. 20x, H.E.	71
Figura 16	- Fotomicrografia do grupo LBI (4J). Tecido conjuntivo fibroso organizado presente em grande extensão do defeito, com fibras colágenas paralelas rico em células. 40x, H.E.....	73
Figura 17	- Fotomicrografia do Grupo LBI (4J). (A) Osso neoformado na extremidade do DTC, estendendo-se em direção ao centro do defeito. A espessura original da calvária não foi restabelecida. (B) Fibras colágenas paralelas próximas ao novo osso. 20x, H.E.	75
Figura 18	- Fotomicrografia do Grupo LBI (6J). (A) Osso neoformado na extremidade do DTC, estendendo-se em direção ao centro do defeito. Não foi restabelecida a espessura original da calvária. 10x, T.M. (B) Tecido conjuntivo fibroso bem organizado e celularizado, com fibras colágenas paralelas e vasos sanguíneos. 20x, T.M.....	77
Figura 19	- Fotomicrografia do Grupo LBI (6J). T.M. (A) Osso neoformado na estendendo-se em direção ao centro do defeito. 10x, (T.M.) (B) Região central do DTC, fibras colágenas paralelas e bem inseridas no tecido ósseo. 40x, T.M.....	79
Figura 20	- Fotomicrografia do Grupo LBI (6J). Visão panorâmica do defeito, novo osso estendendo-se da extremidade em direção ao centro do defeito cirúrgico. A espessura original da calvária não foi mantida. 4x, H.E.	79
Figura 21	- Fotomicrografia do Grupo BO + LBI (4J). H.E. (A) Partículas de BO preenchendo a região central do defeito cirúrgico, mantendo a espessura original da calvária. 20x. (B) Tecido conjuntivo bem organizado ao redor das partículas do BO. 40x.	81
Figura 22	- Fotomicrografia do Grupo BO + LBI (6J). 20x. H.E. (A) e (B) Tecido conjuntivo bem organizado e celularizado envolvendo as partículas de BO que ocupavam parte do defeito original.....	83

Figura 23	- Fotomicrografia do Grupo BO + LBI (6J). 40x. H.E. (A) e (B) Em alguns espécimes foi observado início de formação óssea no interior e entre partículas de BO.	85
Figura 24	- Fotomicrografia do Grupo OA + LBI (4J). (A) Osso neoformado na extremidade e estendendo-se em direção ao centro do defeito, (*) Limite entre osso original da calvária e novo osso. 20x, H.E. (B) Tecido conjuntivo fibroso organizado, celularizado e com fibras colágenas paralelas. 20x, H.E. (C) Partículas de OA sendo incorporadas por novo osso, 40x, H.E.	87
Figura 25	- Fotomicrografia do Grupo OA + LBI (6J). Tecido conjuntivo fibroso organizado, celularizado. (*) Partículas de OA sendo incorporadas por novo osso. 20x, H.E.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Média, desvio-padrão, Q25, mediana e Q75 dos valores de área de osso neoformado (AON).....	91
Tabela 2	- Média, desvio-padrão, Q25, mediana e Q75 dos valores de extensão linear de osso neoformado (ELO).....	91
Tabela	- Média das diferenças de AON (%) na comparação do Grupo C com os demais grupos.....	92
Tabela 4	- Média das diferenças de ELO (%) na comparação do Grupo C com os demais grupos.....	92
Tabela 5	- Média das diferenças de AON (%) na comparação do Grupo LBI (4J) com os demais grupos.....	93
Tabela 6	- Média das diferenças de ELO (%) na comparação do Grupo LBI (4J) com os demais grupos.....	93
Tabela 7	- Média das diferenças de AON (%) na comparação do Grupo LBI (6J) com os demais grupos.....	94
Tabela 8	- Média das diferenças de ELO (%) na comparação do Grupo LBI (6J) com os demais grupos.....	94
Tabela 9	- Média das diferenças de AON (%) na comparação do Grupo OA com os demais grupos.....	95
Tabela 10	- Média das diferenças de ELO (%) na comparação do Grupo OA com os demais grupos.....	95
Tabela 11	- Média das diferenças de AON (%) dos Grupos OA+ LBI (4J) e OA+LBI (6J) em relação aos demais grupos.....	96
Tabela 12	- Média das diferenças de ELO (%) dos Grupos OA+ LBI (4J) e OA+LBI (6J) em relação aos demais grupos.....	96
Tabela 13	- Média das diferenças de AON (%) dos Grupos BO com BO+LBI (4J) e BO+LBI (6J) e dos grupos BO+LBI (4J) com BO+LBI (6J).....	97
Tabela 14	- Média das diferenças de ELO (%) dos grupos BO com BO+LBI (4J) e BO+LBI (6J) e dos grupos BO+LBI (4J) com BO+LBI (6J).....	97
Tabela 15	- Média, desvio-padrão, Q25, mediana e Q75 dos valores de APR (%).....	97
Tabela 16	- Comparação múltipla dos valores de APR (%).	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LBI	laser de baixa intensidade
DTC	defeito de tamanho crítico
C	Controle
BO	Osso bovino inorgânico / Bio-Oss
OA	Osso autógeno
AT	Área total
AON	Área de osso neoformado / Área de novo osso
APR	Área de partículas remanescentes
ELD	Extensão linear do defeito
ELO	Extensão linear de osso neoformado / novo osso
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
H.E.	Hematoxilina e Eosina
T.M.	Tricrômico de Masson

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	Modelo Experimental.....	31
2.2	Enxertos e substitutos ósseos	32
2.3	Osso Bovino	34
2.4	Laser de Baixa Intensidade	37
3	PROPOSIÇÃO	43
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1	Modelo Experimental.....	49
4.2	Procedimento Cirúrgico	50
4.3	Protocolos de Aplicação do Laser de Baixa Intensidade	54
4.4	Processamento tecidual	55
4.5	Análise histomorfométrica	56
4.6	Análise estatística.....	58
5	RESULTADOS.....	59
5.1	Análise Histológica Qualitativa	61
5.2	Análise histométrica e estatística	91
6	DISCUSSÃO.....	99
7	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS	113
	ANEXO	129

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Dentre as causas mais comuns que levam à perda óssea alveolar estão as injúrias traumáticas acidentais, exodontias traumáticas, doença periodontal avançada e cirurgia periodontal ressectiva (Abrams, 1980), além das desordens anatômicas ou congênitas (Mardas et al., 2008). Diante desta situação clínica, o osso alveolar geralmente pode apresentar largura e altura reduzida, impossibilitando assim a instalação de implantes osseointegrados ou dificultando a reabilitação protética na área (Barboza et al., 2002). Assim a perda óssea alveolar constitui um dos maiores problemas a ser solucionado em periodontia e implantodontia (Mardas et al., 2008).

A regeneração óssea tem se tornado uma necessidade nos casos de deficiências ósseas quando associada às terapias periodontais e para favorecer a instalação de implantes (Pankejad et al., 2008). O sucesso na terapia com implantes osseointegrados é dependente de um volume ósseo adequado na área de sua instalação, caso contrário seu prognóstico pode ser afetado negativamente em longo prazo (Lekholm et al., 1986).

Atualmente, com a introdução de técnicas avançadas de enxertia e substitutos ósseos adequados tem sido possível aumentar volume, espessura e altura óssea em áreas com deficiência e assim, permitir a colocação de implantes em posições e angulações ideais, resultando em reabilitação protética mais previsível e aceitável (Hoexter, 2002). Além disso, a utilização de enxerto ou substitutos ósseos também é preconizada pela ação de estabilizar o coágulo sanguíneo, promover arcabouço e reduzir o risco de colapso dos tecidos moles dentro do defeito (Baldini et al., 2011).

Para que um material seja utilizado como enxerto ou substitutos ósseo, ele deve possuir propriedades biológicas essenciais no mecanismo da regeneração óssea, como a osteogênese, osteocondução e osteoindução. Osteogênese é a capacidade de formar novo osso a partir células mesenquimais indiferenciadas ou células osteoprogenitoras viáveis presentes no enxerto ou originárias do hospedeiro, as quais proliferam e se diferenciam em osteoblastos. No mecanismo de osteoindução, a presença de moléculas osteoindutoras no enxerto pode induzir a diferenciação osteoblástica de células mesenquimais indiferenciadas dos tecidos do hospedeiro adjacentes (circundantes) ao enxerto. A osteocondução é a capacidade do enxerto

de atuar passivamente como arcabouço para a formação óssea, orientando a migração dos elementos celulares e vasculares envolvidos com a formação óssea (Dinoupoulos et al., 2012).

O osso autógeno é considerado o material ideal *gold standard* para cirurgias ósseas reconstrutivas devido a sua característica única (osteogênicas, osteocondutivas e osteoindutoras) (Hallman & Thor, 2008). Entretanto, para a utilização do osso autógeno há necessidade de um segundo sítio cirúrgico intra (Misch et al. 1992; Proussaefs et al., 2002) ou extra-oral (Iizuka et al., 2004; Breine & Branemark, 1980; Tessier, 1992) quando grandes quantidades são necessárias (Ohayon et al., 2011).

Os procedimentos cirúrgicos para remoção do osso autógeno envolvem alguns inconvenientes ao paciente como maior morbidade (Nkenk et al., 2002; Clavero & Lundgren, 2003; Tessier et al., 2005), podendo haver risco hemorrágico, dor pós-operatória ou sensibilidade alterada no sítio doador. Além disso, o osso autógeno sofre um processo de reabsorção imprevisível, influenciado pelas diferentes áreas doadoras, o que pode interferir no processo cicatricial, e a quantidade disponível é limitada. Com isso, muito tem sido pesquisado no intuito de desenvolver substitutos ósseos para minimizar estas desvantagens apresentadas na utilização do osso autógeno.

Dessa forma, existe uma grande necessidade clínica por materiais de enxertia óssea e técnicas que possam ser alternativas ou substituir o enxerto autógeno (Schwartz et al., 2008).

Os substitutos ósseos atuam como materiais de preenchimento, e provêm um arcabouço que permite a colonização por células envolvidas na formação óssea, com neoformação em médio ou longo prazo (Ohayon, 2011). Um substituto ósseo adequado deve favorecer a proliferação de novos vasos e manter seu suporte biológico para ser gradualmente substituído por novo osso (Jensen et al., 2006).

Um dos substitutos ósseos mais utilizado é o osso bovino desproteínizado, que apresenta similaridade à porção inorgânica (Hallman & Thor, 2008) do osso autógeno, além de propriedades químicas e físicas semelhantes (Esposito et al., 2008; Amerio et al., 2010; Nevins et al., 2011). Estudos têm demonstrado a superior biocompatibilidade e osteocondutividade do osso bovino (Bio-Oss®) em relação quando comparado a outros substitutos ósseos (Stavropoulos et al., 2003; Hammerle et al., 1998; Iezzi et al., 2008).

Apesar de bastante utilizado, e atuar como excelente osteocondutor, o osso bovino não possui propriedades osteogênicas ou osteoindutoras. Com isso, o tempo de cicatrização é

maior em relação ao osso autógeno (Hallman et al., 2002; Hallman & Nordin, 2004). Portanto, técnicas ou materiais que possam melhorar as propriedades do osso bovino são alternativas interessantes na cicatrização óssea.

O desenvolvimento de biomateriais, idealmente elaborados com a incorporação de fatores de crescimento ósseos e peptídeos bioativos, representam uma importante linha de pesquisa na cirurgia óssea reconstrutiva (Jung et al., 2003). Portanto, qualquer adição de fatores de crescimento na área a ser regenerada com substituo ósseo poderia ser benéfica, e nesse contexto a utilização do laser de baixa intensidade (LBI) é uma modalidade terapêutica não invasiva com propriedades biológicas, que já vem sendo bastante estudada e com resultados favoráveis na cicatrização tecidual em modelos animais e humanos (Woodruff et al., 2004; Almeida et al 2014; Cunha et al 2014; Esper 2015).

Tem sugerido um papel do LBI também na cicatrização óssea, pois eleva a síntese de ATP (Morimoto et al., 1994; Yu et al., 1997), aumenta a proliferação fibroblástica (Pinheiro & Gerbi, 2006) e síntese de colágeno (Lam et al., 1982), além de aumentar a atividade de células ósseas (Ghahroudi et al., 2014). Os efeitos do LBI melhorando a regeneração óssea já foram sugeridos anteriormente em uma revisão sistemática (Woodruff et al., 2004) e meta-análise (Tajali et al., 2010). Esta técnica pode ser considerada uma alternativa para auxiliar os substitutos ósseos no processo regenerativo (Ghahroudi et al., 2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Modelo Experimental

A seleção de modelos pré-clínicos com frequência leva em consideração a escala filogenética. Se animais pequenos como roedores podem reproduzir dados confiáveis, este modelo é preferível frente a outros modelos animais (Gomes & Fernandes, 2011). Roedores podem apresentar algumas vantagens em relação a outros modelos animais por apresentar melhor custo-benefício, facilidade de acomodação e manuseio, além de permitir a realização de condições experimentais padronizadas em indivíduos geneticamente similares (Jordan, 1971; Pellegrini et al., 2009). Ratos e coelhos são os animais utilizados com maior frequência nas pesquisas biomédicas (Pellegrini et al., 2009).

O'loughlin et al. (2008) revisaram estudos publicados em periódicos de ortopedia a frequência de utilização de cada modelo animal no reparo de fraturas, e encontraram maior quantidade de estudos utilizando ratos (38%), sendo seguidos por coelhos (19%) , camundongos (13%), ovelhas (11%), cães (9%), cabra (4%) e outros (4%). Pesquisas básicas que desejam avaliar a efetividade e bioatividade de materiais dependem bastante da utilização de ratos, por estes modelos apresentarem similaridade do ponto de vista biológico, genético e imunológico, o que permite obter elevado nível de reprodutibilidade experimental (Gomes & Fernandes, 2011).

Os ratos são animais desejáveis para estudar alterações fisiológicas relacionadas à idade (Benatti et al., 2006), aos efeitos das doenças sistêmicas e terapias farmacológicas na destruição e regeneração tecidual (Graves et al., 2008), podendo ser um modelo efetivo para avaliar os efeitos do LBI na regeneração óssea, como já realizado em alguns estudos (Almeida et al., 2014; Cunha et al. 2013; Pretel et al., 2007).

Os materiais de regeneração óssea têm sido testados em defeitos cirúrgicos de diferentes tamanhos, sejam em tíbia (Matsumoto et al., 2009; Fernandes et al., 2013), fêmur (Pinheiro et al., 2003; Weber et al., 2006) e calvária (Marques et al., 2015; Almeida et al., 2014; Cunha et al., 2014). A evolução da cicatrização que ocorrerá é em grande parte dependente do tamanho do defeito realizado (Hjörting-Hansen, 1971; Simons, 1980).

Defeitos em calvárias são bastante utilizados e adequados para pesquisa de materiais regenerativos pelo fato da calvária possuir uma estrutura que permite confeccionar um defeito uniforme, padronizado e reprodutível, que é facilmente analisado radiograficamente ou histologicamente. Além disso, a localização anatômica da calvária favorece a realização do defeito cirúrgico por apresentar um tamanho adequado, por suportar a implantação de biomateriais e ainda permitir a comparação precisa entre materiais utilizados (An & Friedman, 1999). Uma das vantagens de utilizar a calvária é que o osso original está presente apenas nas bordas do defeito (Donos et al., 2004), o que dificulta seu fechamento completo em casos de defeitos críticos.

Defeitos de tamanho críticos (DTC) são situações desafiadoras para o processo de cicatrização, e podem estar relacionados com o tamanho do defeito realizado em cada animal e região. Schmitz & Hollinger (1986) definiram defeito ósseo crítico como o menor tamanho de defeito intra-ósseo em ossos e espécies particulares que não cicatrizam espontaneamente durante toda a vida do animal. Recentemente, Gosain et al. (2000) definiram DTC como sendo um defeito com tamanho que não cicatrizará completamente durante o período de duração do estudo. Muito tem sido discutido quanto ao tamanho de DTC realizados em calvárias de ratos. Alguns autores consideram como DTC aqueles realizados com 8 mm de diâmetro (Messora et al., 2008; Park et al. 2009; Scothford et al., 2011). Outros estudos (Donos et al., 2004; Furlaneto et al., 2007; Mardas et al., 2008; Cunha et al., 2014; Almeida et al., 2014) e uma recente revisão sistemática consideraram que defeitos com 5 mm de diâmetro em calvária de ratos são de tamanho crítico (Vajgel et al., 2014). Portanto, se um menor defeito pode ser realizado e ser considerado DTC, significa menor morbidade ao animal e deve ser a opção de escolha.

2.2 Enxertos e substitutos ósseos

Avançada reabsorção dos maxilares, seja por trauma, doença periodontal, defeitos anatômicos ou congênitos (Mardas et al., 2008) pode dificultar o tratamento reabilitador quando é desejada a instalação de implantes, e o volume ósseo residual nestes casos resulta em prejuízos estéticos e funcionais ao paciente. Desta forma, adequada quantidade e qualidade óssea são importantes para o sucesso da reabilitação oral (Nkenke, 2014).

Os procedimentos de aumento ósseo são indicados para restabelecer volume adequado de osso para a instalação de implantes, e tem como finalidade estimular ou facilitar a formação de novo osso na área do defeito ósseo. Diversos materiais podem ser utilizados com este intuito, como os enxertos autógenos, alógenos, xenógenos e materiais aloplásticos ou mesmo a combinação destes materiais (Wheller, 1997).

O osso autógeno (OA) é considerado como padrão ouro nos procedimentos de regeneração óssea, por possuir propriedades osteogênicas, osteoindutivas e osteocondutoras, podendo ser proveniente de áreas intra ou extra-orais (Hjorting-Hansen 2002; Jensen et al., 2006). Estas propriedades do OA são fundamentais para a regeneração óssea, resultando na união do enxerto ao leito receptor (Giannoudis et al., 2005). Desta forma, a remodelação e neoformação óssea são possíveis pela presença de células como osteoblastos, osteoclastos, monócitos e mesenquimais indiferenciadas presentes no osso autógeno (Hallman & Thor, 2008; Rickert et al., 2012).

Por apresentar excelentes propriedades, o OA ainda continua sendo o material de escolha nos procedimentos de aumento ósseo. Sua elevada previsibilidade tem sido comprovada, pois taxas de sucesso superiores a 95% são demonstradas quando utilizado em procedimentos regenerativos realizados em maxilares severamente reabsorvidos (Joos & Kleinheinz, 2000). Além disso, a utilização do OA apresenta mínimo risco de transmissão de doenças (Hallman & Thor, 2012).

Apesar de considerado osteogênico, o OA apresenta algumas desvantagens como a disponibilidade limitada, taxa de reabsorção imprevisível além da morbidade aumentada na área doadora. Taxas de complicações podem variar de 8,5% a 39%, e incluem a formação de hematomas, hemorragias, injúrias neurais, dor pós-operatória e em algumas situações dor crônica (Banwart & Asher, 1976; Younger & Chapman, 1989; Constantino & Friedman 1994; Patka et al., 1998; Finkemeier, 2002).

Acredita-se que quando o OA é utilizado, a formação de novo osso ocorre em duas fases. Durante a primeira fase (aproximadamente 4 semanas) a principal fonte de células para formar osso é proveniente do enxerto. Na segunda fase, as células do hospedeiro iniciam sua contribuição ao processo, e as células do endóstio e medula óssea produzem mais da metade do novo osso (Gray & Elves, 1979). A utilização do OA pode apresentar algumas limitações, como em procedimentos cirúrgicos extensos, nos quais a viabilidade das células contidas no

OA pode ser comprometida (Sandhu et al., 1999). Também não é recomendado em crianças, idosos, ou pacientes com doenças malignas ou infecciosas (Van der Stok et al., 2011).

A reabsorção do substituto ósseo e completa remodelação do novo osso formado após procedimentos de regeneração óssea são características ideais de material de enxertia óssea. Porém a taxa de reabsorção de diferentes substitutos ósseos pode ser variável. A reabsorção rápida de alguns materiais pode comprometer sua utilização, especialmente em área estética (Hallman & Thor, 2008) na qual volume e altura óssea são características importantes. A reabsorção relativamente rápida do OA tem despertado interesse na procura por materiais mais estáveis (Hallman & Thor, 2008).

O material ideal para preenchimento de defeitos ósseos ainda não foi encontrado. Em razão das desvantagens do osso autógeno, principalmente quanto à morbidade do sítio doador e disponibilidade limitada, a busca por substitutos ósseos tem se intensificado. Substitutos ósseos devem ser biocompatíveis e atrativos para proliferação de vasos sanguíneos com consequente formação de novo osso (Jensen et al., 2006). Uma das alternativas bastante estudadas é o osso bovino desproteinizado, Bio-Oss®.

2.3 Osso Bovino

O osso bovino apresenta similaridade morfológica ao osso humano (Hallman & Thor, 2008) com macroporos em seu interior com tamanho similar àqueles do osso esponjoso (Klinge et al., 1992). O osso bovino mais utilizado é o Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça). Apesar da ausência de componentes orgânicos, o Bio-Oss® possui cristais de hidroxiapatita, podendo assim permitir a inserção de osteoblastos e a deposição de matriz óssea (Tapety et al., 2004). Vários estudos experimentais sugerem que o Bio-Oss® (BO) atua como uma matriz para a inserção e proliferação osteoblástica (Hoffman et al., 1999; Stephan et al., 1999), sendo considerado um arcabouço ideal para neoformação óssea (Klinge et al., 1992).

O tamanho e a estrutura das partículas do BO formam um sistema de poros interligados favorável ao crescimento de vaso sanguíneo (Hammerle et al., 1997). As partículas porosas do BO formam um arcabouço apropriado para a absorção de células osteogênicas, e a forma dessas partículas faz com os espaços entre elas sejam adequados para

a penetração dos vasos sanguíneos (Stavropoulos et al., 2004; Nomura et al., 2005). Dessa forma, a arquitetura trabecular do osso bovino permite uma rápida estabilização do coágulo e revascularização, propiciando a migração de células ósseas, e então a aposição de osso neoformado (Hammerle et al., 1998; Stavropoulos et al., 2004; Scarano et al., 2004; Amerio et al., 2010).

Estudos comprovam que o BO possui biocompatibilidade e excelentes propriedades osteocondutoras (AlRuhaimi, 2001), sendo superior quando comparado com outros substitutos ósseos (Hämmerle et al., 1998; Stavropoulos et al., 2003; Iezi et al., 2008). Existem relatos de que o BO possui índices de osteocondutividade similares aos do enxerto ósseo autógeno (Berglundh & Lindhe, 1997; Carmagnola et al., 2000).

O BO tem sido utilizado em estudos clínicos (Artzi et al., 2000; Zitzmann et al., 2001) e em animais (Hürzeler et al., 1997) para preservar rebordo alveolar após exodontias (Wang et al., 2004; Mardas et al., 2010; Nevins et al., 2011), levantamento de seio maxilar (Valentini et al., 2000; Hatano et al., 2004; Hallman et al., 2005), aumento horizontal de rebordo alveolar (Hämmerle et al., 2007) e deiscências ósseas associadas à instalação de implantes (Hammerle & Lang, 2001; Mayfield et al., 2001; Ersanli et al. 2004; De Santis et al., 2011; Caneva et al., 2011). O BO é um dos mais utilizados materiais de enxerto em casos de levantamentos de seios maxilares (Smiler et al., 1992; Wetzel et al., 1995; Hürzeler et al., 1997; Valentini & Abensur., 1997; Haas et al., 1998; Artzi et al., 2001a; Artzi et al., 2001b).

Um estudo realizado por Artzi et al. (2003) avaliou histologicamente o papel do BO associado ou não à membranas colágenas (M) em defeitos ósseos criados em mandíbulas de cães após cicatrização de 3, 6, 12 e 24 meses. Após 3 e 6 meses novo osso foi incorporado às partículas de BO. Em 12 e 24 meses, os defeitos tratados com coágulo sanguíneo apresentaram arquitetura côncava, enquanto nos grupos tratados com BO, as partículas de ainda estavam presentes, mas completamente envolvidas por novo osso. Os defeitos tratados apenas com membrana apresentaram excelente cicatrização óssea, porém áreas de tecido mole não mineralizado estavam presentes. Os autores relataram que o BO é excelente osteocondutor, e o íntimo contato entre suas partículas pode atuar como uma barreira física inibindo a migração de tecido mole na área do defeito quando não utilizada membrana.

A reabsorção do osso bovino desproteinizado é uma questão controversa. Existem relatos de que partículas de osso bovino no interior de defeitos ósseos falham em reabsorver, e permanecem como corpo inerte circundado por osso do hospedeiro (Traini et al., 2007; Iezzi

et al., 2008; Traini et al., 2008). Por outro lado, outros autores relataram que após meses de cicatrização, atividade osteoclástica é observada nas partículas e acredita-se que, com o tempo essas partículas remodelam-se e novo osso é formado. Entretanto, é reconhecido que esse processo é lento, e de acordo com Tadjoeidin et al. (2003) a substituição ocorre em uma taxa de cerca de 10% ao ano (Klinge et al. 1992; Berglundh & Lindhe 1997; Hürzeler et al., 1997; Hämmerle et al., 1998).

Em um estudo realizado em humanos Lindhe et al. (2014) relataram que o BO atrasa a cicatrização de alvéolos, e que as partículas não são reabsorvidas após 6 meses, porém tornam-se envolvidas por novo osso, e a conformação dimensional do rebordo permanece inalterada.

Berglundh & Lindhe (1997) avaliaram a cicatrização de defeitos ósseos de alvéolos de extração em cães, preenchidos com BO nos tempos de 3 meses (grupo I) e 7 meses (grupo II). No grupo II, foi instalado implante após 3 meses de cicatrização do BO. Entre 3 e 7 meses, ocorreu a diminuição da quantidade de partículas indicando que o BO foi integrado e posteriormente substituído por novo osso. Desta forma, o BO preencheu os critérios necessários para o material ser considerado osteocondutivo (Ouhayon, 1996).

Um estudo realizado em calvária de coelhos avaliou a formação óssea em grupos tratados com BO nos tempos de cicatrização de 4 e 8 semanas. Maior formação óssea foi demonstrada em relação ao grupo controle em ambos os períodos de cicatrização. Nas avaliações intra-grupos a formação óssea aumentou após 8 semanas no grupo tratado com BO (Pankejad et al., 2014).

O BO assim como OA são os materiais de enxertia mais utilizados e pesquisados nos casos de levantamento de seio maxilar (Jensen et al., 2012a; Jensen et al., 2012b). Estudos longitudinais com tempo de acompanhamento superior a 6 anos, avaliaram a sobrevivência de implantes osteointegrados em áreas enxertadas com BO, demonstrando variar de 91 a 100% (Valentini et al., 2000; Valentini & Abensur 2003; Froum et al., 2008).

Thorwarth et al., em 2006, avaliaram a associação do BO ao OA no tratamento de defeitos de calvárias de porcos em diferentes tempos de cicatrização. Quando o BO foi utilizado isoladamente, o processo de neoformação óssea progrediu até o final do estudo. Em períodos iniciais a formação de novo osso estava presente na base e porções laterais do defeito estendendo em direção à região central. Após 26 semanas ocorreu o completo preenchimento

ósseo do defeito, com partículas de BO envolvidas por novo osso. No grupo que associou BO a 25% em quantidade do OA, diferente do grupo tratado com BO, a formação óssea iniciou-se não apenas nas extremidades laterais do defeito mas também ocupou inicialmente na região central do defeito. A formação óssea progrediu de acordo com os tempos de cicatrização, porém a consolidação óssea ocorreu após 6 semanas. Desta forma, os autores concluíram que a adição de 25% de OA ao BO acelerou a formação óssea, devido às propriedades osteoindutivas do OA. Além disso, esta combinação de OA e BO tem implicações clínicas importantes durante procedimentos de instalação de implantes em dois estágios, pois acelerar a cicatrização poderia levar a uma reabertura mais rápida.

A combinação do OA ao BO foi considerada vantajosa, porém outras técnicas e materiais também podem ser associados na tentativa de acelerar a cicatrização óssea. A utilização do laser de baixa intensidade (LBI) tem sido sugerida para acelerar o processo de cicatrização óssea.

2.4 Laser de Baixa Intensidade

LASER é um acrônimo de “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” (Tajali et al., 2010; Baxter 2002), e pode ser considerado como amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. O primeiro laser foi desenvolvido por Maiman em 1960, e desde então, tem sido amplamente utilizado nas áreas médicas e odontológicas (Khadra et al., 2004; Aoki et al., 2004).

A emissão estimulada da radiação produz uma luz com características únicas que não ocorrem na natureza, como coerência (ondas sincrônicas), monocromática (único comprimento de onda) e colimada (raios paralelos) (Clayman & Kuo, 1997). Estudos recentes têm sido realizados com laser que utiliza aparelhos que possuem como meio ativo o GaAs ou GaAlAs, com comprimentos de onda variando no espectro do infra-vermelho (Posten et al., 2005; Almeida et al., 2014; Cunha et al., 2014; Esper 2015). Este é conhecido pela sua alta capacidade de penetração nos tecidos quando comparado com outros tipos de lasers (Nissan et al., 2006).

O LBI é uma forma de energia eletromagnética que pode propiciar efeitos biológicos nos tecidos. Nos últimos anos um melhor entendimento de seus efeitos tem sido relatados, e

seu uso tem sido mais difundido entre pesquisadores e clínicos (Kazen Shakouri et al., 2009). O LBI tem sido efetivo por suas propriedades anti-inflamatórias, potencial de acelerar a cicatrização de tecido mole e estimular a formação de novos vasos sanguíneos (Renno et al., 2007; Hou et al., 2008). Entre os muitos efeitos fisiológicos do LBI é importante ressaltar que a terapia pode também aumentar a liberação de fatores de crescimento de fibroblastos (Saygun et al., 2008), a remodelação e a reparação óssea (Saito, 1997; Ueda, 2001; Khadra et al., 2004).

Quando utilizado no momento do procedimento cirúrgico, o LBI promove aumento no fluxo sanguíneo que resulta no recrutamento de mediadores pró e anti-inflamatórios além de fatores de crescimento no sítio cirúrgico. Portanto, o LBI atua na fase inicial da inflamação, aumentando a proliferação de fibroblastos, osteoblastos, células e células epiteliais, aumentando assim a síntese de proteínas e fatores de crescimento oriundos destes tipos celulares, e consequentemente acelera o processo cicatricial (Passanezi et al., 2015).

Os mecanismos pelo quais o LBI estimula a regeneração óssea pode ser multifatorial, e inclui a promoção da angiogênese (Oron et al., 2001, Barbosa et al., 2013), a habilidade para estimular a proliferação celular, incluindo fibroblastos, os quais tem capacidade de secretar colágeno, principal componente orgânico observado durante o reparo ósseo (Pinheiro et al., 2006; Gerbi et al., 2008; Torres et al., 2008; Pinheiro et al., 2012), proliferação e diferenciação de células osteogênicas (Yaakobi et al., 1996); aumento na produção de ATP (Karu et al., 1995; Morimoto et al., 1994) e respiração mitocondrial (Morimoto et al., 1994). Ainda é incerto se a biomodulação com LBI na formação óssea é consequência de estímulo das células mesenquimais ou de osteoblastos (Obradovic et al., 2009).

A cicatrização tecidual é um processo complexo, que envolve respostas locais e sistêmicas. Geralmente, a cicatrização óssea requer maior tempo para ocorrer quando comparada à do tecido mole. Apesar de vários estudos relatarem o benefício da utilização do LBI na cicatrização do tecido mole, seus efeitos no tecido ósseo necessitam ser melhor compreendidos, pois apesar de vários autores sugerirem resultados positivos, ainda há controvérsias (Pinheiro et al., 2001; Pinheiro et al., 2003).

A terapia com LBI parece induzir a regeneração óssea por aumentar a atividade das células ósseas, podendo ser uma alternativa para melhorar as características do substitutos ósseos. Estudos realizados em calvárias de ratos demonstraram que o LBI propicia maior formação óssea quando utilizado isoladamente ou associado a materiais de enxertia óssea

(Almeida et al., 2014; Cunha et al., 2014; Esper 2015). Portanto, existem evidências de que o LBI apresenta efeitos positivos no metabolismo ósseo e também na consolidação de fraturas (Renno et al., 2007; Kazen Shakouri et al., 2009).

Um estudo realizado em tíbias de coelhos que avaliou a cicatrização óssea ao redor de implantes e utilizou o LBI, demonstrou aumento de contato osso-implante após 3 e 6 semanas. Neste estudo, foram utilizadas várias sessões de aplicação do LBI com intervalos de 48 h durante 14 dias. Entretanto, clinicamente várias sessões poderiam tornar o protocolo mais restrito de utilização do LBI associado a implantes osseointegrados. Assim, os autores sugeriram que futuras investigações são necessárias para estabelecer parâmetros do LBI como densidade de energia, comprimentos de onda ideais e protocolos de irradiação a ser utilizados na implantodontia (Pereira et al., 2009).

Não existem parâmetros universalmente aceitos para a utilização do LBI. Diferentes tipos de lasers com diferentes comprimentos de onda têm sido utilizados com diferentes doses e protocolos de tratamento (Basford et al., 1995; Ghahroudi et al., 2014; Marques et al., 2015). Também não é possível um único parâmetro, isoladamente, produzir resposta fotobiológica. É possível que o efeito do LBI na regeneração óssea depende não somente da dose total de irradiação, mas também da duração e modo de irradiação (Pinheiro et al., 2009). A falta de informações e a inconsistência fornecida nos trabalhos sobre protocolos de tratamento com laser dificulta uma avaliação sobre dosimetria do laser (Tajali et al., 2010).

Um recente estudo avaliou dois protocolos distintos na cicatrização de defeitos ósseos em calvárias de ratos. No primeiro protocolo foi utilizada aplicação do LBI a cada 48h, totalizando 7 aplicações trans-cutâneas e iniciando 24h após a cirurgia ($\lambda=830$ nm, fluência de 16 J/cm^2 , 50 mW). No segundo protocolo foram utilizadas 3 aplicações, sendo a primeira trans-cirúrgica ($\lambda=830$ nm, fluência de $3,7 \text{ J/cm}^2$, 50 mW) seguida por duas aplicações trans-cutâneas, após 48 h e 96 h ($\lambda=830$ nm, fluência de 16 J/cm^2 , 50 mW). Os autores relataram que os dois protocolos melhorou a diferenciação osteoblástica. Aos 15 dias, maior formação óssea histométrica foi evidenciada utilizando o protocolo 2, além da expressão mais intensa de osteocalcina, indicando estágio mais avançado na remodelação óssea quando utilizado este protocolo (Marques et al., 2015). Desta forma, a utilização do LBI no trans-operatório e a diminuição das sessões de aplicação pode ser favorável no âmbito clínico.

Apesar do tecido ósseo apresentar boa capacidade regenerativa, sua cicatrização pode ser prejudicada em decorrência de pobre suprimento sanguíneo na área, instabilidade

mecânica e pela presença de tecidos com maior capacidade proliferativa. Como uma alternativa para melhorar a cicatrização em defeitos ósseos maiores, a utilização de várias técnicas incluindo o LBI tem sido bastante amplamente estudada. Resultados positivos têm sido demonstrados *in vivo* (Silva Júnior et al., 2002; Gerbi et al., 2005) e *in vitro* (Stein et al., 2005) com a utilização do LBI.

Poucos estudos avaliaram o papel do LBI associado a substitutos ósseos (Pinheiro et al., 2003; Gerbi et al., 2005; Pinheiro et al., 2011; Ghahroudi et al., 2014). No entanto, sua utilização pode promover um pós-operatório mais rápido e confortável ao paciente (Pinheiro & Gerbi, 2006).

Gerbi et al (2005) avaliaram o papel do LBI na cicatrização de defeitos ósseos criados em fêmur de ratos. Os defeitos foram criados com 3 mm² de diâmetro e tratados com osso bovino (Gen-ox[®]) associado ou não a membrana (Gen-derm[®]), e LBI. Este estudo foi realizado em 42 ratos, machos e fêmeas, que foram submetidos a sete aplicações do LBI, com 16 J/cm² por sessão, em intervalos de 48h. Os animais foram eutanasiados com 15, 21 e 30 dias. No grupo controle, a cicatrização evoluiu com o tempo porém não houve restabelecimento da espessura após 30 dias. Nos grupos em que o osso bovino foi irradiado pelo LBI (4 J/cm²) por ponto, com ou sem utilização de membrana, ocorreu a formação de tecido conjuntivo com fibras colágenas bem organizadas e reparo completo da cortical óssea após 30 dias, diferindo do grupo no qual o osso bovino foi usado isoladamente, no qual não ocorreu reparo ósseo completo. Os autores concluíram que o LBI apresentou efeitos positivos na cicatrização óssea quando utilizado com osso bovino, independente da utilização de membrana.

Um estudo realizado por Cunha et al. (2014) avaliou o efeito do LBI na cicatrização óssea em calvárias de ratos. Foi utilizado protocolo de aplicação única no trans-operatório ($\lambda=730$ nm; 100 mW, 210 J/cm², 6 J/ponto). Os defeitos foram tratados com OA ou BO, irradiado ou não com LBI. Após 30 dias, todos os grupos irradiados apresentaram maior formação óssea que o controle, e que os grupos preenchidos apenas com OA ou OB. O LBI acelerou a cicatrização dos defeitos ósseos quando utilizado com este protocolo.

Os diferentes tipos de modelo experimental, protocolos de aplicação do LBI e substitutos ósseos utilizados dificultam resultados conclusivos quanto à utilização do LBI. Futuros estudos comparando diferentes comprimentos de onda e quantidade de irradiação com o laser são necessários para definir a estratégia de aplicação ideal. No entanto, estes estudos

deveriam fornecer informações completas como o tempo de aplicação por ponto e total e a área de tratamento. Dessa forma, poderia ser calculada a fluência e energia total entregue no sistema, e comparação entre os estudos de dosimetria do laser poderia ser feita (Tajali et al., 2010).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O propósito deste estudo foi avaliar diferentes protocolos de aplicação do LBI associados ou não ao osso bovino inorgânico (Bio-Oss[®]), na cicatrização de defeitos ósseos em calvárias de ratos.

Hipótese nula (h_0) : Não há diferença estatística entre os protocolos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo Experimental

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° 038/2013) (anexo A).

Foram utilizados 90 ratos machos (*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 climatizado, com ciclo de 12 horas de luz por dia e temperatura entre 22 e 24° C. Os animais receberam ração sólida selecionada e água *ad libitum*. Eles foram aleatoriamente divididos em 9 grupos experimentais (n=10). Os grupos foram denominados: **1) Grupo C** (Controle, preenchido apenas com coágulo sanguíneo), **2) Grupo LBI (4J)** (Laser de Baixa Intensidade – GaAlAs, 730 nm, 100 mW, 4J, 140 J/cm², - TheraLase DMC[®], São Carlos, Brasil), **3) Grupo LBI (6J)** (Laser de Baixa Intensidade – GaAlAs, 730 nm, 100 mW, 6J, 210 J/cm² - TheraLase DMC[®], São Carlos, Brasil), **4) Grupo BO** (Bio-Oss[®] - (0,25-1mm) Geistlich Pharma AG., Wolhusen, Switerland), **5) Grupo BO + LBI (4J)** (Bio-Oss[®] + Laser de Baixa Intensidade), **6) Grupo BO + LBI (6J)** (Bio-Oss[®] + Laser de Baixa Intensidade), **7) Grupo OA** (Osso autógeno), **8) Grupo OA + LBI (4J)** (Osso autógeno + Laser de Baixa Intensidade), **9) Grupo OA + LBI (6J)** (Osso autógeno + Laser de Baixa Intensidade).

Após a confecção do DTC, foi aleatorizado (por sorteio) o tratamento a ser realizado por um outro membro da equipe. Desta forma, tanto o operador quanto o responsável pela aplicação do LBI desconheciam o tratamento a ser realizado no momento da realização do defeito cirúrgico

4.2 Procedimento Cirúrgico

Para realização de todos os procedimentos experimentais, os ratos foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (0,02 ml/kg) e cloridrato de quetamina (0,4 ml/kg). Após tricotomia e anti-sepsia da parte dorsal do crânio de cada animal, foi realizada incisão semilunar na calvária e um retalho de espessura total rebatido em direção posterior (Figura 1).

Figura 1- Após incisão semi-lunar, retalho total deslocado em direção posterior.

Um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5 mm de diâmetro foi então criado com uma trefina acoplada em peça de mão de baixa rotação (Figura 2), sob irrigação abundante com solução salina estéril, com auxílio de um guia cirúrgico confeccionado previamente (Figura 3), e a dura-máter foi preservada durante a craniotomia (Figura 4).

Figura 2 – Broca Trefina (5mm) em posição na região em que foi realizado o DTC.

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

Figura 4- Defeito cirúrgico confeccionado, com preservação da dura-máter e via encefálica.

Foram realizadas marcações (em “L”), com auxílio do guia cirúrgico, 2 mm anterior e 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico com broca carbide tronco-cônica FG-700 (Microdont Micro Usinagem de Precisão Ltda., São Paulo, Brasil) sob irrigação contínua com solução salina estéril e, posteriormente, preenchidas com amálgama (Figura 5). O maior eixo de cada “L” estava localizado sobre uma linha imaginária longitudinal que dividia o defeito cirúrgico ao meio (Almeida et al., 2014; Cunha et al., 2014). Estas marcações foram realizadas para identificação da parte mais central do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial e, também, para localizar as suas margens ósseas originais durante a análise histométrica (Messora et al., 2008; Garcia et al., 2012; Almeida et al., 2014; Cunha et al., 2014; Esper, 2015).

Figura 5 - Marcações em “L” 2 mm anterior e 2 mm posterior às margens do DTC preenchidas com amálgama.

No Grupo C, o defeito cirúrgico foi preenchido apenas com coágulo sanguíneo. No Grupo LBI (4J) e LBI (6J), o defeito cirúrgico foi preenchido com coágulo sanguíneo e irradiado com laser de baixa intensidade, utilizando dose de 4 J/cm² ou 6 J/cm² por ponto, respectivamente.

No Grupo OA, o defeito cirúrgico foi preenchido com osso autógeno da calvária particulado; no Grupo OA+LBI (4J) e no Grupo OA+LBI (6J) os defeitos foram preenchidos com osso autógeno da calvária particulado e irradiados com LBI 4 J/cm² e LBI 6 J/cm² por ponto, respectivamente.

No Grupo BO, o defeito cirúrgico foi preenchido com Bio-Oss[®] (0,02 g); nos Grupos BO + LBI (4J) e BO + LBI (6J) os defeitos foram preenchidos com Bio-Oss[®] e irradiados com LBI (140 J/cm² LBI (210 J/cm²), respectivamente.

O tecido mole foi reposicionado e suturado para obter-se um fechamento primário da ferida (fio seda 4-0, Ethicon, *Johnson & Johnson*, São José dos Campos, Brasil). Cada animal recebeu injeção intra-muscular de 24.000 unidades de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge[®] Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

4.3 Protocolos de Aplicação do Laser de Baixa Intensidade

O laser utilizado foi o TheraLase DMC[®], modo de emissão contínuo, com meio ativo GaAlAs, comprimento de onda de 730 nm, potência de 100 mW, fluência de 140 J/cm² (4J por ponto em aplicação única) e tempo de irradiação 40s nos grupos que receberam o protocolo LBI (4J). Nos grupos que receberam o protocolo LBI (6J) foi utilizado a fluência de 210 J/cm² (6J por ponto em aplicação única) e tempo de irradiação de 60s. Foram realizados quatro pontos na superfície do defeito cirúrgico criado e um ponto central (Figura 6). As irradiações foram realizadas apenas uma vez após a confecção do defeito cirúrgico, com auxílio de um guia pré-fabricado seguindo as dimensões do defeito. Nos grupos LBI (4J) e LBI (6J), a irradiação foi realizada após o preenchimento com coágulo sanguíneo. Nos grupos preenchidos com coágulo sanguíneo, a irradiação central foi realizada sobre o coágulo, enquanto nos grupos que utilizaram material de enxerto (BO ou OA) a irradiação central foi realizada após preenchimento do defeito com o material. Nos grupos que utilizaram LBI (4J) cada ponto recebeu uma quantidade de energia de 4J e foi utilizada fluência de 140 J/cm², enquanto os grupos que utilizaram LBI (6J) cada ponto recebeu uma quantidade de energia de 6J e foi utilizada fluência de 210 J/cm². Assim, foi entregue ao sistema 20J nos grupos que utilizaram o protocolo LBI (4J) e 30J nos que utilizaram o protocolo LBI (6J). As aplicações foram realizadas seguindo um protocolo padronizado e os pontos de aplicação realizados na superfície do defeito, seguindo as posições “do relógio” (12h, 3h, 6h, 9h) além do ponto central (Almeida et al., 2014) (Figura 6) .

Figura 6 – Esquema dos pontos de aplicação do LBI.

4.4 Processamento tecidual

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias pós-operatórios, com 5 mg/ml da associação de cloridrato de quetamina e xilazina. A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. As peças foram fixadas em solução de formol neutro a 10%. Após lavagem das peças em água corrente, as mesmas foram descalcificadas em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 18% (Titriplex® III, Merck, EUA). Então, cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usando-se as marcações de amálgama (maior eixo “L”) como referência, depois cortes transversais foram feitos tendo como referência o menor eixo das marcações em “L”, determinando os com maior precisão os limites do defeito cirúrgico original (Figura 7).

Após processadas as peças, as mesmas foram incluídas em parafina (Histosec® pastilhas, Merck, EUA). Cortes seriados longitudinais, com 6 µm de espessura, foram realizados iniciando-se a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram

corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H.E.) e Tricrômico de Masson (T.M.) para análises com microscopia de luz.

Figura 7 – Espécime dividido longitudinalmente em dois blocos após a descalcificação, ao longo do centro do defeito cirúrgico original, utilizando as marcações em “L” como referência.

4.5 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada por meio de um sistema de avaliação de imagem por computador, utilizando o “software” ImageLab 2000 (Dracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil).

Quatro cortes histológicos foram selecionados para análise histológica e histométrica, representando a área central do defeito cirúrgico original. Para padronizar a análise histomorfométrica das imagens digitais, foi seguida a metodologia proposta por Messora et al. (2008). Em cada imagem, foi realizada uma delimitação da área a ser analisada, correspondente à região do osso da calvária onde o defeito foi originalmente criado, denominada Área Total (AT). Dentro da AT, foram delimitadas as áreas de osso neoformado (AON) e, também, as áreas de partículas remanescentes dos materiais implantados (APR). A AT foi medida em mm^2 e representou 100% da área a ser analisada. AON e APR também foram medidas obtidas em mm^2 e calculadas como porcentagens da AT (Figura 8).

Figura 8 – Delimitação do defeito cirúrgico original, da área total do defeito (AT), da área de osso neoformado (AON) e da área de partículas remanescentes (APR) de BO.

Foram calculadas as medidas de extensão linear do defeito criado (ELD) tendo como limites as extremidades delimitadas para a medida de AT. A partir disto, medidas de extensão linear de novo osso (ELO) também foram calculadas (em mm) e avaliadas como uma porcentagem da extensão total do defeito cirúrgico originalmente criado (Figura 9).

Figura 9 – Medidas de extensão linear do defeito (ELD) e extensão linear de novo osso (ELO)

Todas as análises histológica e histométrica foram realizadas por um examinador cego ao estudo e previamente calibrado.

4.6 Análise estatística

A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram analisadas. Todas as variáveis seguiram distribuição normal. Assim, foi utilizado o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey, para identificar as diferenças entre os grupos. Foi adotado nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Foram perdidos durante o processamento laboratorial, 3 animais do Grupo LBI (6J), 2 animais dos grupos OA/LBI (6J) e LBI (6J), e um animal dos grupos C, OA, OA/LBI (4J) e BO/LBI (4J).

5.1 Análise Histológica Qualitativa

Em todos os grupos não foi observado infiltrado inflamatório significativo no pós-operatório de 30 dias. A quantidade de novo osso formado variou entre os diversos grupos de tratamento (Figuras 10 e 11).

Figura 10 – Fotomicrografia dos grupos (A) Controle, (B) Bio-Oss® e (C) Osso Autógeno. Visão panorâmica do defeito cirúrgico. Diferença na extensão de novo osso formado entre os diversos grupos de tratamento. 4x, H.E.

Figura 11 – Fotomicrografia dos grupos (A) LBI (4J), (B) LBI (6J), (C) BO + LBI (4J), (D) BO + LBI (6J), (E) OA + LBI (4J) e OA + LBI (6J). Visão panorâmica do defeito cirúrgico. Diferença na extensão de novo osso formado entre os diversos grupos de tratamento. 4x, H.E.

Grupo C - Novo osso foi observado apenas nas extremidades do defeito original (Figura 12). Não ocorreu fechamento do defeito com novo osso e não foi restabelecida a espessura da calvária original em nenhum espécime. O tecido conjuntivo apresentava fibras colágenas paralelas preenchendo a maior extensão do defeito cirúrgico criado.

Figura 12 – A) Fotomicrografia do grupo C. Extensão de osso neoformado apenas nas extremidades do defeito cirúrgico original. 10x, H.E. B) Fibras colágenas paralelas preenchendo a maior extensão do defeito cirúrgico criado. 20x, T.M.

Grupo BO - O defeito estava preenchido quase na sua totalidade por partículas de BO. O tecido conjuntivo fibroso, apresentava-se organizado e envolvendo as partículas (Figura 13). Novo osso foi encontrado apenas nas extremidades do defeito (Figura 14). Não ocorreu fechamento do defeito cirúrgico com novo osso, porém a espessura da calvária foi restabelecida em todos os espécimes.

Figura 13 – Fotomicrografia do grupo BO. O defeito preenchido quase na sua totalidade por partículas de BO. Tecido conjuntivo fibroso organizado e envolvendo as partículas de BO. 20x, H.E.

Figura 14 – Fotomicrografia do grupo BO. Osso neoformado apenas nas extremidades do defeito. Não ocorreu fechamento do defeito cirúrgico com novo osso, porém a espessura da calvária foi restabelecida em todos os espécimes. 10x, H.E.

Grupo OA – O defeito cirúrgico apresentava tecido conjuntivo fibroso organizado preenchendo o defeito cirúrgico, e poucas partículas em apenas dois espécimes (Figura 15). Novo osso e matriz osteóide foram observados em extensões variáveis. Apenas em um espécime o defeito foi preenchido com novo osso em sua completa extensão porém, não ocorreu restabelecimento da espessura da calvária.

Figura 15 – Fotomicrografia do grupo OA. Tecido conjuntivo organizado preenchendo o defeito cirúrgico, e pouca quantidade partículas remanescentes de OA nos espécimes. 20x, H.E.

Grupo LBI (4J) - Tecido conjuntivo estava presente em grande extensão do defeito, com fibras colágenas paralelas (Figura 16). Novo osso foi encontrado em extensões variáveis em direção ao centro do defeito (Figura 17). Em nenhum espécime ocorreu fechamento ósseo completo e também não ocorreu restabelecimento da espessura da calvária original.

Figura 16 – Fotomicrografia do grupo LBI (4J). Tecido conjuntivo fibroso organizado presente em grande extensão do defeito, com fibras colágenas paralelas rico em células. 40x, H.E.

Figura 17 – Fotomicrografia do Grupo LBI (4J). (A) Osso neoformado na extremidade do DTC, estendendo-se em direção ao centro do defeito. A espessura original da calvária não foi restabelecida. (B) Fibras colágenas paralelas próximas ao novo osso. 20x, H.E.

Grupo LBI (6J) - Presença de tecido conjuntivo fibroso bem organizado, com fibras colágenas paralelas foi observada na maioria dos espécimes. Novo osso estava presente em extensões variáveis (Figuras 18 e 19) e em um espécime ocorreu fechamento ósseo do defeito em extensão (Figura 20). Não foi restabelecida a espessura original da calvária em todas as espécimes.

Figura 18 – Fotomicrografia do Grupo LBI (6J). (A) Osso neoformado na extremidade do DTC, estendendo-se em direção ao centro do defeito. Não foi restabelecida a espessura original da calvária. 10x, T.M. (B) Tecido conjuntivo fibroso bem organizado e celularizado, com fibras colágenas paralelas e vasos sanguíneos. 20x, T.M.

Figura 19 – Fotomicrografia do Grupo LBI (6J). T.M. (A) Osso neoformado na estendendo-se em direção ao centro do defeito. 10x, (T.M.) (B) Região central do DTC, fibras colágenas paralelas e bem inseridas no tecido ósseo. 40x, T.M.

Figura 20 – Fotomicrografia do Grupo LBI (6J). Visão panorâmica do defeito, novo osso estendendo-se da extremidade em direção ao centro do defeito cirúrgico. A espessura original da calvária não foi mantida. 4x, H.E.

Grupo BO+LBI (4J) - O tecido conjuntivo apresentava-se bem organizado ao redor das partículas do BO que preencheram grande parte do defeito (Figura 21). Novo osso foi encontrado estendendo-se em direção ao centro, porém não ocorreu fechamento completo do defeito em nenhuma espécime.

Figura 21 – Fotomicrografia do Grupo BO + LBI (4J). H.E. (A) Partículas de BO preenchendo a região central do defeito cirúrgico, mantendo a espessura original da calvária. 20x. (B) Tecido conjuntivo bem organizado ao redor das partículas do BO. 40x.

Grupo BO+LBI (6J) - Foi observado que o tecido conjuntivo estava bem organizado e vascularizado envolvendo as partículas de BO que ocupavam parte do defeito original (Figura 22) Em alguns espécimes foi observado início de formação óssea no interior e entre partículas de BO (Figura 23). Ocorreu fechamento do defeito em extensão óssea em três espécimes, e a espessura da calvária original foi restabelecida em todos os espécimes.

Figura 22 – Fotomicrografia do Grupo BO + LBI (6J). 20x. H.E. (A) e (B) Tecido conjuntivo bem organizado e celularizado envolvendo as partículas de BO que ocupavam parte do defeito original.

Figura 23 – Fotomicrografia do Grupo BO + LBI (6J). 40x. H.E. (A) e (B) Em alguns espécimes foi observado início de formação óssea no interior e entre partículas de BO.

Grupo OA+LBI (4J) - O tecido conjuntivo fibroso apresentava fibras colágenas paralelas, vascularizado e com vários fibroblastos. Novo osso foi observado nas extremidades e estendendo-se em direção ao centro do defeito (Figura 24 A e B). Alguns espécimes apresentavam partículas sendo incorporadas por novo osso (Figura 24 C). Poucas partículas foram observadas no interior do defeito. Não ocorreu fechamento do defeito com novo osso em extensão ou área em nenhum dos espécimes.

Figura 24 – Fotomicrografia do Grupo OA + LBI (4J). (A) Osso neoformado na extremidade e estendendo-se em direção ao centro do defeito, (*) Limite entre osso original da calvária e novo osso. 20x, H.E. (B) Tecido conjuntivo fibroso organizado, celularizado e com fibras colágenas paralelas. 20x, H.E. (C) Partículas de OA sendo incorporadas por novo osso, 40x, H.E.

Grupo OA+LBI (6J) - O tecido conjuntivo fibroso apresentava-se bem organizado com bastante fibroblasto e preenchendo grande extensão do defeito cirúrgico. Novo osso foi observado em extensões variáveis, não ocorreu fechamento em extensão ou área do defeito original e não foi restabelecida a espessura da calvária original. Algumas partículas já estavam sendo envolvidas por novo osso (Figura 25).

Figura 25 – Fotomicrografia do Grupo OA + LBI (6J). Tecido conjuntivo fibroso organizado, celularizado. (*) Partículas de OA sendo incorporadas por novo osso. 20x, H.E.

5.2 Análise histométrica e estatística

A estatística descritiva, com os valores das médias e desvios padrão de AON e ELO estão descritas nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

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

Grupo	N	Média	Desvio-Padrão	Q25	Mediana	Q75
C	9	9,96	4,49	6,64	9,52	14,32
LBI (4J)	10	30,17	8,13	24,07	28,53	40,16
LBI (6J)	7	47,67	8,66	43,96	44,58	55,41
OA	9	11,36	7,88	6,26	9,49	14,11
OA+LBI (4J)	9	27,99	14,41	15,28	25,09	43,69
OA+LBI (6J)	8	39,15	16,72	25,96	40,41	53,36
BO	10	11,36	7,89	6,22	9,49	16,66
BO+LBI (4J)	9	23,53	5,31	19,29	21,42	28,16
BO+LBI (6J)	10	48,57	28,22	29,08	42,22	76,31

O Grupo BO+LBI (6J) demonstrou maior média de AON ($48,57 \pm 28,22\%$) e a menor média foi do Grupo C ($9,96 \pm 4,49\%$).

Tabela 2- Média, desvio-padrão, Q25, mediana e Q75 dos valores de extensão linear de osso neoformado (ELO).

Grupo	N	Média	Desvio-Padrão	Q25	Mediana	Q75
C	9	16,00	9,86	9,34	12,50	20,55
LBI (4J)	10	50,48	13,09	39,29	50,24	63,21
LBI (6J)	7	76,55	15,54	63,49	69,89	94,13
OA	9	58,38	28,33	31,12	70,57	80,18
OA+LBI (4J)	9	45,63	19,99	28,53	38,59	67,25
OA+LBI (6J)	8	53,86	8,10	46,18	56,09	57,98
BO	10	27,38	15,54	17,10	23,60	36,38
BO+LBI (4J)	9	29,39	9,95	22,22	26,37	38,51
BO+LBI (6J)	10	73,17	24,87	50,98	79,41	100

Para todas as variáveis avaliadas foram encontradas diferenças 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.

As comparações das médias de AON e ELO do Grupo C com os demais grupos, estão representadas nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3- Média das diferenças de AON (%) na comparação do Grupo C com os demais grupos.

Grupo	Média das Diferenças	Intervalo de Confiança
C – LBI (4J)	-20,21	-41,40 a 0,99
C – LBI (6J)	- 37,71*	-60,96 a – 14,46
C – OA	-21,02	-42,77 a 0,72
C – OA+LBI (4J)	-18,03	-39,78 a 3,71
C – OA+LBI (6J)	-29,29*	-51,61 a -6,77
C – BO	-1,40	-22,60 a 19,80
C – BO+LBI (4J)	-13,56	-35,31 a 8,18
C – BO+LBI (6J)	-38,60*	-59,80 a -17,41

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

Os grupos LBI (6J), OA+LBI (6J) e BO+LBI (6J) demonstraram diferenças estatisticamente significativas em relação ao Grupo C. A maior diferença foi na comparação do Grupo BO+LBI (6J) com o Grupo C.

Tabela 4- Média das diferenças de ELO (%) na comparação do Grupo C com os demais grupos.

Grupo	Média das Diferenças	Intervalo de Confiança
C – LBI (4J)	-34,48*	-62,08 a -6,88
C – LBI (6J)	- 60,55*	-89,17 a -31,93
C – OA	- 42,38*	-69,15 a -15,61
C – OA+LBI (4J)	-29,63*	-56,40 a -2,86
C – OA+LBI (6J)	-37,86*	-65,45 a -10,26
C – BO	-11,38	-37,47 a 14,72
C – BO+LBI (4J)	-13,39	-40,17 a 13,38
C – BO+LBI (6J)	-57,18*	-83,27 a -31,08

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

Apenas os grupos BO e BO+LBI (4J) não demonstraram diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao Grupo C. A maior diferença foi na comparação do Grupo LBI (6J) com o Grupo C.

As comparações das médias de AON e ELO do Grupo LBI (4J) com os demais grupos, estão representadas nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5- Média das diferenças de AON (%) na comparação do Grupo LBI (4J) com os demais grupos.

Grupo	Média das Diferenças	Intervalo de Confiança
LBI (4J) - LBI (6J)	-17,50	-40,24 a 5,23
LBI (4J) - OA	- 0,81	-22,01 a 20,39
LBI (4J) – OA+LBI (4J)	2,17	-19,02 a 23,37
LBI (4J) – OA+LBI (6J)	-8,98	-30,87 a 12,90
LBI (4J) – BO	18,81	-1,82 a 39,44
LBI (4J) – BO+LBI (4J)	6,64	-14,55 a 27,84
LBI (4J) – BO+LBI (6J)	-18,40	-39,03 a 2,23

Tabela 6- Média das diferenças de ELO (%) na comparação do Grupo LBI (4J) com os demais grupos.

Grupo	Média das Diferenças	Intervalo de Confiança
LBI (4J) - LBI (6J)	-26,07	-55,46 a 3,32
LBI (4J) - OA	- 7,89	-35,49 a 19,70
LBI (4J) – OA+LBI (4J)	4,84	-22,75 a 32,44
LBI (4J) – OA+LBI (6J)	-3,37	-31,77 a 25,02
LBI (4J) – BO	23,10	-3,83 a 50,04
LBI (4J) – BO+LBI (4J)	21,09	-6,50 a 48,68
LBI (4J) – BO+LBI (6J)	- 22,69	-49,63 a 4,24

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas de AON E ELO, quando comparado o Grupo LBI (4J) com os demais grupos (Tabelas 5 e 6).

As comparações das médias de AON e ELO do Grupo LBI (6J) com os demais grupos, estão representadas nas tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7- Média das diferenças de AON (%) na comparação do Grupo LBI (6J) com os demais grupos.

Grupo	Média das Diferenças	Intervalo de Confiança
LBI (6J) - OA	16,69	-6,55 a 39,94
LBI (6J) - BO	36,31*	13,57 a 59,04
LBI (6J) - OA+LBI (4J)	19,68	-3,56 a 42,93
LBI (6J) - BO+LBI (4J)	24,15*	0,89 a 47,40
LBI (6J) - OA+LBI (6J)	8,52	-15,36 a 32,40
LBI (6J) - BO+LBI (6J)	-0,89	-23,63 a 21,84

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

Diferenças estatisticamente significativas em AON foram observadas entre o Grupo LBI (6J) e os grupos BO e BO+LBI (4J).

Tabela 8- Média das diferenças de ELO (%) na comparação do Grupo LBI (6J) com os demais grupos.

Grupo	Média das Diferenças	Intervalo de Confiança
LBI (6J) - OA	18,17	-10,44 a 46,79
LBI (6J) - BO	49,17*	21,19 a 77,16
LBI (6J) - OA+LBI (4J)	30,92*	2,30 a 59,54
LBI (6J) - BO+LBI (4J)	47,16*	18,54 a 75,78
LBI (6J) - OA+LBI (6J)	22,70	-6,69 a 52,09
LBI (6J) - BO+LBI (6J)	3,37	-24,61 a 31,36

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

O Grupo LBI (6J) apresentou diferenças estatisticamente significativas das médias de ELO na comparação com os grupos BO, OA+LBI (4J) e BO+LBI (4J).

Nas tabelas 9 e 10 estão representadas as comparações de ELO e AON, respectivamente, do Grupo OA com os demais grupos.

Tabela 9- Média das diferenças de AON (%) na comparação do Grupo OA com os demais grupos.

Grupo	Média das Diferenças	Intervalo de Confiança
OA – BO	19,62	-1,58 a 40,81
OA - OA+LBI (4J)	2,98	-18,76 a 24,74
OA - BO+LBI (4J)	7,45	-14,29 a 29,20
OA - OA+LBI (6J)	-8,17	-30,59 a 14,25
OA - BO+LBI (6J)	-17,59	-38,78 a 3,61

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o Grupo OA e os demais grupos.

Tabela 10- Média das diferenças de ELO (%) na comparação do Grupo OA com os demais grupos.

Grupo	Média das Diferenças	Intervalo de Confiança
OA – BO	31,00*	4,90 a 57,09
OA - OA+LBI (4J)	12,74	-14,03 a 39,52
OA - BO+LBI (4J)	7,45*	-14,29 a 29,20
OA - OA+LBI (6J)	-8,17	-30,59 a 14,25
OA - BO+LBI (6J)	-17,59	-38,78 a 3,61

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

O Grupo OA demonstrou maiores médias de ELO, com diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos BO e BO+LBI (4J).

Nas tabelas 11 e 12 estão apresentadas as comparações de AON e ELO, respectivamente, dos grupos OA+LBI (4J) e OA+LBI (6J) com os outros grupos.

Tabela 11- Média das diferenças de AON (%) dos Grupos OA+ LBI (4J) e OA+LBI (6J) em relação aos demais grupos.

Grupo	Média das Diferenças	Intervalo de Confiança
OA+LBI (4J)- BO+LBI (4J)	4,46	-17,28 a 26,21
OA+LBI (4J)- BO	16,63	-4,56 a 37,83
OA+LBI (4J)- OA+LBI (6J)	-11,16	-33,58 a 11,26
OA+LBI (4J)- BO+LBI (6J)	-20,57	-41,77 a 0,62
OA+LBI (6J) - BO	27,79*	5,90 a 49,67
OA+LBI (6J) – BO+LBI (4J)	15,63	-6,79 a 38,04
OA+LBI (6J) – BO+LBI (6J)	-9,41	-31,30 a 12,47

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas quando comparados os grupos OA+LBI (6J) e BO.

Tabela 12- Média das diferenças de ELO (%) dos Grupos OA+ LBI (4J) e OA+LBI (6J) em relação aos demais grupos.

Grupo	Média das Diferenças	Intervalo de Confiança
OA+LBI (4J)- BO+LBI (4J)	4,46	-17,28 a 26,21
OA+LBI (4J)- BO	18,26	-7,83 a 44,35
OA+LBI (4J)- OA+LBI (6J)	- 8,22	-35,82 a 19,37
OA+LBI (4J)- BO+LBI (4J)	16,24	-10,53 a 43,01
OA+LBI (4J)- BO+LBI (6J)	-27,54*	-53,64 a 1,44
OA+LBI (6J) - BO	26,48	-0,45 a 53,42
OA+LBI (6J) – BO+LBI (4J)	24,46	-3,13 a 52,06
OA+LBI (6J) – BO+LBI (6J)	-19,32	-46,26 a 7,61

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

O Grupo OA+LBI (4J) demonstrou maior média de ELO, com diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo BO+LBI (6J).

Nas tabelas 13 e 14 estão apresentadas as comparações de AON e ELO, respectivamente, dos grupos BO e BO+LBI (4J), BO e BO+LBI (6J), BO+LBI (4J) e BO+LBI (6J).

Tabela 13- Média das diferenças de AON (%) dos Grupos BO com BO+LBI (4J) e BO+LBI (6J) e dos grupos BO+LBI (4J) com BO+LBI (6J).

Grupo	Média das Diferenças	Intervalo de Confiança
BO - BO+LBI (4J)	-12,16	-33,36 a 9,03
BO - BO+LBI (6J)	-37,20*	-57,83 a -16,57
BO+LBI (4J)- BO+LBI (6J)	-25,04*	-3,84 a 46,24

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

Tabela 14- Média das diferenças de ELO (%) dos grupos BO com BO+LBI (4J) e BO+LBI (6J) e dos grupos BO+LBI (4J) com BO+LBI (6J).

Grupo	Média das Diferenças	Intervalo de Confiança
BO - BO+LBI (4J)	-2,01	-28,11 a 24,08
BO - BO+LBI (6J)	-45,80*	-71,19 a -20,40
BO+LBI (4J) - BO+LBI (6J)	-47,83*	-17,69 a -69,87

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas de AON e ELO na comparação entre os grupos BO x BO+LBI (4J) x BO+LBI (6J).

Na tabela 15 está apresentada estatística descritiva, com os valores das médias e desvios padrão de APR. Na tabela 16 estão descritas as comparações de APR dos grupos BO x BO+LBI (6J), BO x OA+LBI (4J), BO x BO+LBI (4J), BO+LBI (6J) x OA+LBI (4J), BO+LBI (6J) x BO+LBI (4J) e OA+LBI(4J) x BO+LBI (4J).

Tabela 15 - Média, desvio-padrão, Q25, mediana e Q75 dos valores de APR (%).

Grupo	N	Média	Desvio-Padrão	Q25	Mediana	Q75
OA+LBI (4J)	9	9,02	7,45	1,31	7,66	16,84
BO	10	38,73	6,95	34,62	37,71	52,92
BO+LBI (4J)	9	24,64	5,61	19,08	26,06	29,29
BO+LBI (6J)	10	16,74	15,25	0	22,42	28,38

Tabela 16 - Comparação múltipla dos valores de APR (%).

Grupos	Média das diferenças	Intervalo de Confiança
BO – BO+LBI (6J)	21,99*	10,21 a 33,76
BO – OA+LBI (4J)	29,71*	17,61 a 41,80
BO – BO+LBI (4J)	14,09*	1,99 a 26,19
BO+LBI (6J) - OA+LBI (4J)	7,72	-4,37 a 19,82
BO+LBI (6J) - BO+LBI (4J)	-7,89	-19,99 a 4,20
OA+LBI(4J) - BO+LBI (4J)	-15,62*	-28,03 a 3,20

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

O Grupo BO apresentou maior APR que os demais grupos. As diferenças foram estatisticamente significativas. Quando comparado o Grupo BO+LBI (6J) aos grupos OA+LBI (4J) e BO+LBI (4J) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. O Grupo OA+LBI(4J) apresentou menor APR que BO+LBI (4J), com diferenças estatisticamente significativas.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os diferentes protocolos de LBI, quando avaliados isoladamente, demonstraram resultados favoráveis quanto à extensão linear de osso neoformado (ELO) em relação ao Grupo C. Entretanto, apenas o LBI (6J) levou a maior área de osso neoformado (AON) em relação ao Grupo C. Quando o LBI foi associado ao BO, apenas o Grupo BO+LBI (6J) apresentou maior AON e ELO que o Grupo C.

Até o momento, não existe consenso quanto ao melhor modo de utilização do LBI na regeneração óssea (Pinheiro et al., 2006), com uma diversidade de protocolos relatada na literatura (Lopes et al., 2007; Matsumoto et al., 2009; Pereira et al. 2009; Gharoudhi et al., 2014) e, também a utilização de vários modelos experimentais, com diferentes resultados (Rockkind et al., 2004; Pereira et al., 2009; Fernandes et al., 2013; Ghahroudi et al., 2014; Marques et al., 2015).

Os defeitos de calvária de ratos são considerados excelentes para testar materiais de regeneração óssea, por sua anatomia, pouca quantidade de osso medular e ainda por possuir osso remanescente apenas nas extremidades do defeito (Donos et al., 2004). O modelo animal (roedores) por sua vez, apresenta vantagens por permitir padronização devido a similaridade genética, fácil manuseio e melhor custo-benefício frente a utilização de outros modelos animais (Vajgel et al., 2014).

Além de controvérsias existentes na literatura quanto ao tamanho de defeito cirúrgico considerado como crítico, torna-se difícil comparar trabalhos pelas diferentes metodologias empregadas (Vajgel et al. 2014). Alguns autores realizam mais de um defeito na calvária do mesmo animal (Donos et al., 2004; Ghahroudi et al., 2014) com a finalidade de reduzir o número de animais utilizados no estudo (Vajgel et al., 2014), outros realizam um defeito único (Furlaneto et al., 2007; Almeida et al., 2014; Cunha et al., 2014), que é desejável em estudos que utilizam o laser como tratamento evitando o seu efeito sistêmico (Rockkind et al., 1989; Gerbi et al., 2005).

O efeito do LBI na regeneração óssea pode ser multifatorial e inclui a sua capacidade em agir na diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos (Stein et al., 2005), aumento na vascularização (Oron et al., 2001), produção de colágeno (Lam et al., 1982), aumento na liberação de fatores de crescimento na área cirúrgica (Saygun et al., 2008;

Damante et al., 2009). A radiação com LBI absorvida pelas mitocôndrias aumenta a produção de ATP celular, desta forma proporciona melhores condições para proliferação celular, estimulando o processo de cicatrização tecidual (Karu et al., 1995).

Estudos que utilizam LBI na reparação óssea em modelos animais tem sido realizados com diversas sessões de aplicações, e por períodos de tempo que podem chegar a 15 dias, sendo as aplicações repetidas diariamente (Weber et al., 2006), a cada 48h (Pinheiro et al., 2003; Gerbi et al., 2005), ou com aplicações diárias por 20 dias (Ghahroudi et al., 2014). Além disso diferentes potências tem sido empregadas, como 40 mW (Gerbi et al., 2005), 50 mW (Marques et al., 2015), e 300 mW (Ghahroudi et al., 2014), ambos com resultados positivos na neoformação óssea. Entretanto, não existe consenso na literatura quanto ao protocolo ideal de aplicação do LBI (Gharoudhi et al., 2014).

Apesar de estudos relatarem que várias sessões são necessárias para conseguir efeitos do LBI na cicatrização óssea (Tajali et al., 2010), pesquisas de novos protocolos visando melhorar os resultados do LBI com menor quantidades de sessões são alternativas interessantes, uma vez que o LBI atua nas fases iniciais da cicatrização óssea (Ribeiro & Gerbi, 2006; Ozawa et al., 1998; Marques et al., 2015). Portanto, protocolos de utilização do LBI com menor quantidades de aplicações devem ser pesquisados.

Marques et al. (2015) demonstraram, aos 15 dias pós-operatórios, maior formação óssea observada no grupo que utilizou aplicação do LBI na fluência $3,7 \text{ J/cm}^2$, no trans-operatório, seguidas de duas outras aplicações a cada 48h com 16 J/cm^2 , totalizando 3 aplicações, sugerindo que a aplicação diretamente no defeito cirúrgico aumentou a formação óssea. No presente estudo, apenas uma aplicação do LBI no trans-operatório propiciou maior formação óssea que o Grupo Controle, porém dependente da fluência utilizada.

Neste estudo, os resultados foram melhores quando utilizado o LBI com fluência de 210 J/cm^2 em relação ao protocolo de 140 J/cm^2 ambos utilizados no trans-operatório. Alguns autores relatam melhores respostas do LBI na cicatrização quanto maior a dosagem utilizada, e quando o tratamento se inicia 24h após a cirurgia (Torres et al., 2008). No entanto, uma grande variação de protocolos, com diferentes fluências, variando de $76,4 \text{ J/cm}^2$ a 140 J/cm^2 tem sido relatadas. Fernandes et al. (2013) relataram que o LBI com fluência de 100 J/cm^2 modulou o processo inflamatório em defeitos criados em tíbias de ratos e acelerou o processo de cicatrização óssea, podendo estar relacionado a maior expressão de mRNA de genes envolvidos na cicatrização óssea. Estudos realizados por Almeida et al. (2014) e Cunha et al.

(2014) demonstraram maior formação óssea quando utilizado o LBI com 210 J/cm^2 de fluência no trans-operatório, assim como no presente estudo.

Diferentes fluências tem sido descritas em estudos utilizando LBI na cicatrização óssea em coelhos, podendo variar de 86 J/cm^2 a 602 J/cm^2 . Os efeitos do LBI na osteointegração de implantes têm sido descritos com esta grande variação de fluências (Lopes et al., 2005; Lopes et al., 2007). Torna-se difícil comparar resultados e chegar a consensos quanto à atuação do LBI utilizando diferentes modelos experimentais, dosagens utilizadas, e tempos de cicatrização variados. Loreti et al. (2015) em uma revisão relataram que estes fatores devem ser considerados para realização de pesquisas futuras utilizando LBI, seguindo melhor padronização.

A associação do LBI com diferentes substitutos ósseos tem melhorado o desempenho destes materiais na formação de novo osso, seja associado às proteínas morfogenéticas ósseas (Rosa et al., 2012), aos materiais aloplásticos (Fangel et al., 2011) ou xenógenos, como o osso bovino desproteinizado (Ghahroudi et al., 2014; Cunha et al., 2014).

O BO apresenta excelentes propriedades osteocondutivas, pois possui estrutura física semelhante à do osso autógeno, permitindo espaço para a formação de vasos sanguíneos (Ghahroudi et al., 2014), além de possuir alta capacidade hidrofílica, favorecendo a deposição de proteínas osteogênicas (Tapety et al., 2004), liberadas por células osteogênicas nas proximidades das partículas (Kawaguchi et al., 1993; McKee & Nanci 1996), e levando à formação óssea em sua superfície.

O LBI com fluência de 210 J/cm^2 associado ao OA ou BO aumentou a formação óssea em área e extensão em relação ao Grupo Controle. Até o presente momento, não foram encontrados na literatura estudos que comparam protocolos de aplicação de LBI, e que associam diferentes protocolos com os substitutos ósseos utilizados com maior frequência na prática clínica. A associação do BO ao LBI (6J) demonstrou melhores resultados em área e extensão de novo osso que o BO isoladamente. Porém, o LBI não aumentou a área e extensão de novo osso quando associado ao OA em comparação ao material isolado.

Silva et al.(2006) avaliaram diferentes fluências do LBI ($5,1 \text{ J/cm}^2$ e $10,2 \text{ J/cm}^2$) e tempo de aplicação na cicatrização de defeitos ósseos tratados com OA em calvárias de ratos. Os autores observaram maior formação óssea no grupo tratado com fluência de $10,2 \text{ J/cm}^2$, nas primeiras duas semanas de cicatrização, demonstrando que o LBI propiciou a osteogênese

durante os períodos iniciais. Esta maior formação óssea foi consequência da proliferação e diferenciação celular promovida pelo LBI, e a irradiação não possui efeito após 15 dias pois células já estão em estágios avançados de diferenciação. Os autores concluíram que defeitos tratados com OA tiveram a osteogênese estimulada durante os períodos iniciais do processo de cicatrização, e que o efeito do LBI é dose dependente. Desta forma, no presente estudo optou-se por uma aplicação apenas no trans-operatório, porém com fluências maiores para testar o efeito do LBI em uma situação mais desejável para ser reproduzida na clínica.

Um estudo realizado por Pinheiro et al. (2003) avaliou o papel do LBI na cicatrização do osso bovino (Gen-Ox[®]) em defeitos realizados em fêmur de ratos. Os autores encontraram tecido conjuntivo mais organizado aos 15 dias no grupo que associou o LBI ao osso bovino e a formação óssea aumentou aos 21 e 30 dias neste grupo. Os autores concluíram que o LBI promoveu efeitos favoráveis na cicatrização de defeitos tratados com osso bovino, aumentando a formação óssea. Entretanto, o estudo em questão avaliou poucos animais por tempo (2 controles e 3 animais em cada tratamento), realizou apenas a análise histológica e não avaliou todas as possibilidades de terapias isoladas, além de não possuir controle positivo. O estudo não avaliou o osso bovino mais utilizado na literatura, com isso os resultados podem traduzir pouca informação adicional ao efeito do LBI combinado ao osso bovino.

Gharoudhi et al. (2014) avaliaram o papel do LBI na cicatrização do BO em calvárias de coelhos utilizando um protocolo com fluência de 4 J/cm² e potência de 300 mW, com aplicação do LBI no trans-operatório e diariamente por 20 dias. Os autores relataram que a combinação do LBI com BO pode auxiliar no processo de cicatrização óssea, pelo papel exercido pelo LBI. Apesar dos resultados positivos, não foi utilizado controle positivo para comparação (OA) e o animal foi utilizado como unidade amostral, portanto todos os tratamentos foram realizados no mesmo animal, o que pode obscurecer os efeitos de cada terapia, uma vez que o LBI pode apresentar efeitos sistêmicos (Rockind et al., 1989; Gerbi et al., 2005).

Almeida et al. (2014) demonstrou que o LBI (6J) utilizado, no trans-operatório, em defeitos de calvária propiciou AON similar ao grupo tratado com OA, que é o material de enxertia considerado padrão-ouro no tratamento de defeitos ósseos. Entretanto, neste estudo não foram utilizados outros protocolos de aplicação do LBI. Weber et al. (2006) demonstraram em seu estudo maior remodelação óssea quantitativa e qualitativa quando a aplicação do LBI foi realizada no trans-operatório, resultando biomodulação positiva na

cicatrização de defeitos ósseos. Portanto, independente do número de sessões utilizadas, parece importante a utilização do LBI no trans-operatório. Um dos possíveis efeitos do LBI é sua capacidade de favorecer o crescimento e diferenciação de osteoblastos, aumentando a produção de matriz óssea (Khadra et al., 1997; Ozawa et al., 1998; Dörtbudak et al., 2000; Guzzardella et al., 2003). No presente estudo, apesar de não haver análise imunohistoquímica um tecido conjuntivo fibroso bastante organizado e celularizado foi observado nos grupos tratados com LBI (6J), porém apresentando a desvantagem de não restabelecer a espessura da calvária o que pode ter significado clínico importante, uma vez que a manutenção do volume ósseo é uma característica imprescindível no tratamento clínico reabilitador (Artzi et al., 2001).

Alguns autores sugerem que a irradiação sobre material de enxertia pode ser incerta, e que a presença de partículas pode dificultar a difusão da luz nos tecidos (Pinheiro et al., 2003). Entretanto, nenhum estudo até o momento comparou a utilização do LBI sobre o BO e leito cirúrgico com irradiações apenas no leito cirúrgico. No presente estudo, foi realizada também irradiação dos substitutos ósseos. Menor quantidade de partículas foi observada nos grupos tratados com BO associados aos diferentes protocolos do LBI em relação ao BO apenas. Esta menor quantidade de partículas foi acompanhada por maior remodelação óssea histológica nos grupos que foram tratados com BO associado ao LBI. Se a irradiação do BO diminuiu os efeitos do LBI nos tecidos não foi mensurado, pois não foram realizadas comparações com grupos que não irradiaram o substituo ósseo. Pode se afirmar que a irradiação do BO não comprometeu os resultados em termos de neoformação óssea.

Rockind et al. (2004) avaliaram em defeitos criados no processo alveolar em mandíbulas de ratos o efeito do LBI associado ao BO. Os autores relataram que após 14 dias uma maior índice de mineralização tecidual foi demonstrado nos grupos tratados com LBI ou BO associado ao LBI, que caracteriza cicatrização óssea mais rápida. O tratamento combinado produz ainda maior índice de mineralização. Os autores relatam desconhecer os mecanismos envolvidos na melhora apresentada no tratamento combinado e sugerem que mais estudos sejam realizados. O protocolo utilizado no estudo em questão foi utilizando LBI com meio ativo de HeNe, no espectro do vermelho ($\lambda=632,8$ nm) e potencia de 35 mW. Entretanto, no estudo em questão não é citada a fluência utilizada o que dificulta comparações.

Para que ocorra um maior mineralização durante o processo de cicatrização óssea, a angiogênese é necessária. O sistema de poros interconectados das partículas do BO parece possuir tamanho e estrutura para favorecer o crescimento de vasos sanguíneos em seu interior (Hämmerle et al., 1997; Richardson et al., 1999; Valentini & Abensur, 2003). Ainda, a forma das partículas do BO torna os espaços apropriados para que ocorra a penetração de vasos sanguíneos (Sculean et al., 2004; Stavropoulos et al., 2004; Nomura et al., 2005). Se o LBI aumenta a angiogênese, pode favorecer o processo de mineralização tecidual, pois a angiogênese está diretamente relacionada ao crescimento e diferenciação de osteoblastos (Fang et al., 2005).

Um estudo realizado por Rosa et al. (2012) avaliou o papel do LBI isoladamente ou associado à rhBMP-2 em calvária de ratos. Os autores demonstraram resultados favoráveis quando utilizado o LBI com fluência de 120 J/cm^2 , e potência de 60 mW em aplicação única no trans-operatório. A combinação do LBI com BMP foi superior às terapias isoladas. Pretel et al. (2007) também demonstraram efeitos positivos na formação óssea em defeitos de mandíbulas de ratos utilizando aplicação única de LBI com fluência de 178 J/cm^2 . No presente estudo, apesar dos grupos tratados com OA e OA+LBI (6J) apresentarem diferenças significativas de ELO em relação ao Grupo C, apenas o grupo irradiado apresentou maior AON com diferenças estatísticas em relação ao Controle. Assim, o LBI (6J) propiciou maior formação óssea em área, podendo estimular até mesmo o OA e levar a maior formação óssea. Estes achados corroboram os resultados de Rosa et al. (2012) que demonstraram que o LBI pode aumentar a formação de osso quando associado a agentes osteoindutores como, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs).

Por outro lado, foi difícil no presente estudo padronizar o tamanho das partículas de OA, o que pode ter influenciado na quantidade de partículas presentes nos grupos tratados com OA. Existem relatos de que o OA pode ter a sobrevivência de células osteogênicas em seu interior comprometida, bem como a revitalização do enxerto *in situ* dependendo do modo de manipulação do enxerto (Hallman & Thor 2008). O LBI (6J) neste estudo, provavelmente melhorou as propriedades osteogênicas do OA por seus efeitos em osteoblastos ou células mesenquimais indiferenciadas (Obradovic et al., 2009). Também pode ocorrer aumento da vascularização da área quando utilizado o LBI, condição fundamental para o sucesso do enxerto, uma vez que a sobrevivência de células ósseas ocorre apenas se houver distância de no máximo 1 mm do suprimento sanguíneo (Schenk et al., 1994).

Diversos são os protocolos do LBI utilizados atualmente, com resultados que parecem ser dependentes dos parâmetros empregados. Mais estudos são necessários para determinar os melhores parâmetros a ser utilizados (da Silva et al., 2010) em cada situação clínica. De acordo com Woodruff et al. (2004), a fluência parece ser o único parâmetro que poderia influenciar de maneira previsível nos efeitos da terapia com LBI. No presente estudo, em calvária de ratos, a fluência de 210 J/cm² promoveu maior formação óssea quando comparada com a fluência de 140 J/cm².

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O protocolo de LBI (6J) promoveu maior formação óssea quando utilizado isoladamente ou associado ao BO, tornando-se uma opção vantajosa para ser utilizado no tratamento de defeitos ósseos.

A Hipótese nula (H_0) foi parcialmente rejeitada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abrams, L. Augmentation of the deformed residual edentulous ridge for fixed prosthesis. *Compend Contin Educ Dent* 1980;3:205-213.
- Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone graft in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Jt Surg Am* 2002;84(5):716-20.
- Al Ruhaimi, K.A. Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:105–114.
- Amerio et al. The effect of deproteinized bovine bone on osteoblast growth factors and proinflammatory cytokine production. *Clinical Oral Implant Res* 2010; 21:650-655.
- Artzi Z, Nemcovsky CE, Tal H, Dayan D. Histopathological morphometric evaluation of 2 different hydroxyapatite-bone derivatives in sinus augmentation procedures: A comparative study in humans. *J Periodontol* 2001;72:911–920.
- 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;21:395–405.
- Baldini N, De Sanctis M, Ferrari M. Deproteinized bovine bone in periodontal and implant surgery. *Dent Mater.* 2011;27:61-70.
- Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;1;20(9):1055-60.
- 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.
- Baxter D: Low intensity laser therapy. *Electrotherapy, Evidence Based Practice* Edinburg: Churchill Livingstone Kitchen S, Bazin S, 11 2002, 171-189.
- Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implant Res* 1997;8:117-124.
-

Breine U, Brånemark PI. Reconstruction of alveolar jaw bone. An experimental and clinical study of immediate and preformed autologous bone grafts in combination with osseointegrated implants. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1980;14:23–48.

Caneva M, Botticelli D, Morelli F, Cesaretti G, Beolchini M, Lang NP. Alveolar process preservation at implants installed immediately into extraction sockets using deproteinized bovine bone mineral – an experimental study in dogs. *Clin Oral Implant Res* 2012;23:789–796.

Carmagnola D, Berglundh T, Araujo M, Albrektsson T, Lindhe J. Bone healing around implants placed in a jaw defect augmented with Bio-Oss. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2000;27:799–805.

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

Clavero J, Lundgren S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: Comparison of donor site morbidity and complications. *Clin Implant Dent Relat Res* 2003;5:154–160.

Clayman L, Kuo P. *Lasers in Maxillofacial Surgery and Dentistry*. New York: Thieme, 1997: 1–9. *Clin North Am* 1994;27:1037–74.

Costantino PD, Friedman CD. Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol Clin North Am*. 1994;27(5):1037–74.

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].

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

Damante CA, De Micheli G, Miyagi SP, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers in Medical Science* 2009;24:885–891.

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.

De Sanctis, Botticelli D, Pantani F, Pereira FP, Beolchini M, Lang NP. Bone regeneration at implants placed into extraction sockets of maxillary incisors in dogs. *Clin Oral Implant Res* 2011;22:430-437.

Dinopoulos H, Dimitriou R, Giannoudis PV. Bone graft substitutes: What are the options? *Surgeon*. 2012;10:230-9

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

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.

Ersanli S, Olgac V, Leblebicioglu B. Histologic analysis of alveolar bone following guided bone regeneration. *J Periodontol* 2004;5:740-756.

Esper LA. 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]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2015.

Esposito M, Grusovin MG, Kwan S, Worthington HV, Coulthard P. Interventions for replacing missing teeth: bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database System Review* 2008;3:167-184.

Fang TD, Salim A, Xia W, Nacamuli RP, Guccione S, Song HM, et al. Angiogenesis is required for successful bone induction during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res* 2005;20(7):1114–1124.

Fangel R, Bossini PS, Renno AC, Ribeiro DA, Wang CC, Toma RL, et al. 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):078001. doi: 10.1117/1.3598847.

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):101-117.

Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Jt Surg Am* 2002;84(3):454-64.

Froum SJ, Wallace SS, Cho SC, Elian N, Tarnow DP. (2008) Histomorphometric comparison of a biphasic bone ceramic to anorganic bovine bone for sinus augmentation: 6- to 8-month postsurgical assessment of vital bone formation. A pilot study. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 28:273–281

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.

Guzzardella GA, Torricelli P, Nicoli-Aldini N, Giardino R. et al. Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an in vivo comparative study. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(2):226-32.

Haas R, Donath K, Fodinger M, Watzek G. Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus grafting: Comparative histomorphometric findings in sheep. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:107–116.

Hallman M, Thor A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontology* 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.

Hallman M, Sennerby L, Lundgren S. A clinical and histologic evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogenous bone, bovine hydroxyapatite, or a 20:80 mixture. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:635–643.

Hallman M, Sennerby L, Zetterqvist L, Lundgren S. A 3-year prospective follow-up study of implant-supported fixed prostheses in patients subjected to maxillary sinus floor augmentation with a 80:20 mixture of deproteinized bovine bone and autogenous bone Clinical, radiographic and resonance frequency analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005;3:273-80.

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

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

Hatano N, Shimizu Y, Ooya K. A clinical long-term radiographic evaluation of graft height changes after maxillary sinus floor augmentation with a 2:1 autogenous bone/xenograft

mixture and simultaneous placement of dental implants. *Clin Oral Implant Res* 2004;15:339–345.

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.

Hoexter DL. Bone Regeneration graft materials. *J Oral Implantol*. 2002;28:3-7.

Hoffman S, Sidqui M, Abensur D, Valentini P, Missika P. Effects of Laddec on the formation of calcified bone matrix in the rat calvariae cells culture. *Biomaterials* 1999;20:1155-1166.

Hou JF, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei YJ, Hu SS. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells, proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Lasers Surg. Med.* 2008;40:726–733.

Hürzeler MB, Quiñones CR, Kirsch A, Gloker C, Schüpbach P, Strub JR, Caffesse RG. Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part I. Evaluation of anorganic bovine-derived bone matrix. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:476–486.

Hurzeler MB, Quinones CR, Schupback P, Morrison EC, Caffesse RG. Treatment of peri-implantitis using guided bone regeneration and bone grafts, alone or in combination, in beagle dogs. Part 2: histologic findings. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12:168–175.

Iezzi G, Scarano A, Mangano C, Cirotti B, Piattelli A. Histologic results from a human implant retrieved due to fracture 5 years after insertion in a sinus augmented with anorganic bovine bone. *Journal of Periodontology* 2008;79:192-198.

Iizuka T, Smolka W, Hallermann W, Mericske-Stern R. Extensive augmentation of the alveolar ridge using autogenous calvarial split bone grafts for dental rehabilitation. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:607–615.

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 Maxillof Implants* 1996;11:55–56.

Jensen SS, Brogini N, Hjorting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and b-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin. Oral Impl. Res.* 2006;17: 237–243

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* 2001;30:153–156.

Joos U, Kleinheinz J. Reconstruction of the severely resorbed (Class VI) jaws: routine or exception? *J Craniomaxillofac Surg* 2000;28:1–4.

Jung RE, Glauser R, Schärer P, Hämmerle CH, Sailer HF, Weber FE. The effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. A randomized, controlled clinical and histomorphometric study. *Clin Oral Implant Res* 2003;14:556–568.

Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1995;27(3):219-223.

Kazen Shakouri S, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci*. 2009;25:73–77

Kahdra M, Kasem N, Ellingsen JE, Haanes HR, 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* 1997;97:693–700

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

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.

Lam TS, Abergel RP, Meeker CA, Castel JC, Dwyer RM, Uitto J. Laser stimulation of collagen synthesis in human skin fibroblast cultures. *Lasers Life Sci* 1982;1:61–77.

Lekholm U, Ericsson I, Adell R., Slots J. The condition of the soft tissues at tooth and fixture abutments supporting fixed bridges. *J Clin Periodontol* 1986;13:558–562.

Lopes CB, Pinheiro AL, Sathaiah S, Da Silva NS, Salgado MA. Infrared laser photobiomodulation (lambda 830 nm) on bone tissue around dental implants: a Raman spectroscopy and scanning electronic microscopy study in rabbits. *Photomed Laser Surg* 2007;25:96–101.

Lopes CB, Pinheiro AL, Sathaiah S, Duarte J, Cristina- martins M. Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a Raman spectroscopic study. *Photomed Laser Surg*

2005;23:27–31.

Loreti EH1, Pascoal VL, Nogueira BV, Silva IV, Pedrosa DF. Use of Laser Therapy in the Healing Process: A Literature Review. *Photomedicine and Laser Surgery* 2015;33(2):104–116.

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 (PepGenTM): an experimental study in rats. *Clin Oral Implant Res*. 2008;19:1010–1015.

Marques L1, Holgado LA, Francischone LA, Ximenez JP, Okamoto R, Kinoshita A. New LLLT protocol to speed up the bone healing process—histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. *Lasers Med Sci* 2015; 30(4):1225–30

Matsumoto MA1, Ferino RV, Monteleone GF, Ribeiro DA. Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. *Lasers Med Sci* 2009;24:195–201.

Mayfield LJ, Skoglund A, Hising P, Lang NP, Attström R. Evaluation following functional loading of titanium fixtures placed in ridges augmented by deproteinized bone mineral. A human case study. *Clin Oral Implant Res* 2001;12:508–514.

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

McAllister BS, Margolin MD, Cogan AG, Taylor M, Wollins J. Residual lateral wall defects following sinus grafting with recombinant human osteogenic protein – 1 or Bio-Oss in the chimpanzee. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 1998;18:227–239.

McAllister BS, Margolin MD, Cogan, AG, Buck D, Hollinger JO, Lynch SE. Eighteen-month radiographic and histologic evaluation of sinus grafting with anorganic bovine bone in the chimpanzee. *I Journal of Oral Maxillofacial Implants* 1999;14:361–368.

McKee M, Nanci A. Osteopontin: An interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. *Connect Tissue Res* 1996;35:197–205.

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.

Misch CM, Misch CE, Resnik RR, Ismail YH. Reconstruction of maxillary alveolar defects with mandibular symphysis grafts for dental implants: A preliminary procedural report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992;7:360–366.

Morimoto Y, Arai T, Kikuchi M, Nakajima S, Nakamura H Effects of low intensity Argon laser irradiation on mitochondria respiration. *Lasers Surg Med* 1994;15:191–199.

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

Nicola RA, A. R. et al. Nicola RA1, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MT, dos Reis LM, Zângaro RA. 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, Radespiel-Tröger M, Wiltfang J, Schultze-Mosgau S, Winkler G, Neukam FW. Morbidity of harvesting retro-molar bone grafts: A prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:514–521.

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

O’Loughlin P, Morr S, Bogunovic L, Kim A, Park B, Lane J. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90(suppl 1):79 – 94

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.

Ohayon L. Ridge enlargement using deproteinized bovine bone and a bioresorbable collagen membrane: a tomodensitometric, histologic, and histomorphometric analysis. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 2011;31:237.

Oron U, Yaakobi T, Oron A, Hayam G, Gepstein L, Rubin O, Wolf T, Ben Haim S. Attenuation of infarct size in rats and dogs after myocardial infarction by low energy laser irradiation. *Lasers Surg Med* 2009;28:204–211.

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.

Pankejad M, Emtiaz S, Rokn A, Islamy B, Safiri A. Histologic and histomorphometric evaluation of two bone substitute materials for bone regeneration: An experimental study in sheep. *Implant Dent.* 2008;17:471-479.

Park J, Lutz R, Felszeghy E, Wiltfang J, Nkenke E, Neukam FW, Schlegel KA. The effect on bone regeneration of a liposomal vector to deliver BMP-2 gene to bone grafts in peri-implant bone defects. *Biomaterials* 2007;28:2772-2782.

Passanezi E, Damante CA, Rezende MLR, Greggi SLA. Lasers in periodontal therapy. *Periodontology* 2000 2015; 67:268-291.

Patka P, Haarman HJ, Bakker FC. Bone transplantation and bone replacement materials. *Ned Tijdschr Geneesk* 1998;142:893-6.

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

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

Pinheiro AL, Martinez Gerbi ME, de Assis Limeira F Jr, Carneiro Ponzi EA, Marques AM, Carvalho CM, et al Bone Repair following bone grafting hydroxyapatite guided bone regeneration and infra-red laser photobiomodulation: a histological study in a rodent model. *Lasers Med Sci* 2009;24:234-240.

Pinheiro ALB, Gerbi ME. Photo-engineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg* 2006;24:169-178

Pinheiro ALB, Limeira Jr FA, Gerbi MEM, Ramalho LMP, Marzola C, Ponzi EAC. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. *Braz Dent J* 2003;14:177-181.

Pinheiro, A.L.B., Limeira Junior, F.A., Gerbi, M.E.M., Ramalho LMP, Marzola C, Ponzi EAC, 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;21:383-388.

Pinheiro, A.L.B., Oliveira, M.G., Martins, P.P.M. Bio modulatory effects of LLLT on bone regeneration. *Laser Ther.* 2001;13,73-79.

Pretel H, Lizarelli RF, Ramalho LT. Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Repair: Histological Study in Rats. *Lasers in Surgery and Medicine* 2007;39:788–796.

Proussaefs P, Lozada JL, Kleinman A, Rohrer MD. The use of ramus autogenous block grafts for vertical alveolar ridge augmentation: A pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:238–248.

Renno, AC, McDonnell, PA, Parizotto, NA, Laakso, EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed. Laser Surg.* 2007;25:275–280.

Richardson CR, Mellonig JT, Brunsvold MA, McDonell 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.

Rochkind S, Roussio M, Nissan M, Villarreal M, Barr-Nea L, Rees DG. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds and burns. *Lasers Surg Med* 1989;9:174-182.

Rochkind S, Kogan G, Luger EG, Salame K, Karp E, Graif M, Weiss J. Molecular Structure of the bony tissue after experimental trauma to the Mandibular Region followed by Laser Therapy 2004; *Photomedicine and Laser Surgery* 2004;22:249-253.

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.

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

Sandhu HS, Grewal HS, Parvataneni H. Bone grafting for spinal fusion. *Orthop Clin North Am* 1999;30:685-98.

Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B. 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.

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.

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

Silva Junior AN, Pinheiro AL, Oliveira MG, Weismann R, Ramalho LM, Nicola RA RA. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *J Clin Laser Medicine Surgery* 2002;20:83-87.

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

Smiler DG, Johnson PW, Lozada JL, et al. Sinus lift grafts and endosseous implants: Treatment of the atrophic posterior maxilla. *Dent Clin North Am* 1992;36:151-186.

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.

St John TA, Vaccaro AR, Sah AP, Schaefer M, Berta SC, Albert T, et al. Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting. *Am J Orthop* 2003;32(1):18-23.

Staupoulous A, Kostopoulous L, Nyengaard JR, Karring T. Deproteinized bovine bone (Bio-Oss) and bio active glass (Biogram) arrest bone formation when used as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR): an experimental study in the rat. *J Clin Periodontol* 2003;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.

Stephan EB, Jiang D, Lynch S, Bush P, Dziak R. Anorganic bovine bone supports osteoblastic cell attachment and proliferation. *J Periodontol* 1999;70:364-369.

Tadjoedin ES, de Lange GL, Bronckers AL, Lyaruu DM, Burger EH. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *J Clin Periodontol* 2003;3:261-270.

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 Res*. 2010; 4;5:1.

Tapety EI, 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 Implant Res* 2004;15:320-324.

Tessier P, Kawamoto H, Posnick J, Raulo Y, Tulasne JF, Wolfe SA. Complications of harvesting autogenous bone grafts: A group experience of 20,000 cases. *Plast Reconstr Surg* 2005;116:72S–73S.

Tessier P. Autogenous bone grafts taken from the calvarium for facial and cranial applications. *Clin Plast Surg* 1992; 9: 531–538.

Thaller SR, Hoyt J, Borjeson K, Dart A, Tesluk, H. Reconstruction of calvarial defects with anorganic bovine bone mineral (Bio- Oss) in a rabbit model. *J Craniofac Surg* 1993;4:79–84.

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

Ueda Y, Shimizu N. Pulse irradiation of low-power laser stimulates bone nodule formation. *J Oral Sci* 2001;43:55-60.

Vajgel et al., A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res*. 2014;25(8):879-93.

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

Valentini P, Abensur D. Maxillary sinus floor elevation for implant placement with demineralized freeze-dried bone and bovine bone (Bio-Oss): A clinical study of 20 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1997;17:233–241.

Valentini P, Abensur DJ. Maxillary sinus grafting with anorganic bovine bone: a clinical report of long-term results. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:556–560.

Valentini P, Abensur D, Wenz B, Peetz M, Schenk R. Sinus grafting with porous bone mineral (bio-oss) for implant placement: a 5-year study on 15 patients. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 2000;20:245– 253.

Wang HL, Kiyonobu, K, Neiva RF. Socket augmentation: rationale and technique. *Implant Dent* 13: 286–296.

Weber JB, Pinheiro AL, de Oliveira MG, Oliveira FA, Ramalho LM. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. *Photomedicine and Laser Surgery* 2006; 24: 38-44.

Wetzel AC, Stich A, 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.

Woodruff DL, Bounkeo JM, Brannon WM, Dawes KS, Barham CD, Waddell DL, Enwemeka CS. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg* 2004;22:241-247.

Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989;3:192–5.

Yu W, McGowan M, Ippolito K, Lanzafame RJ. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. *Photochem Photobiol* 1997;66:866–871.

Zitzmann NU, Schärer P, Marinello CP, Schüpbach P, Berglundh T. Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: a histologic study in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001; 21: 288–95.

ANEXO

ANEXO A

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 038/2013

Bauru, 24 de outubro de 2013.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Avaliação de diferentes protocolos de aplicação do laser de baixa intensidade associado ou não ao osso bovino inorgânico (Bio-Oss®) na cicatrização de defeitos ósseos criados cirurgicamente em calvárias de ratos. Estudo histológico e histométrico**, de autoria de Michyele Cristhiane Sbrana, sob sua orientação, foi enviado a um relator para avaliação e considerado APROVADO em reunião desta Comissão, realizada no dia **21 de outubro de 2013**.

Solicitamos que qualquer alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que, ao final seja enviado um Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

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