**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

GUILHERME SANTOS MOREIRA

**Avaliação do efeito do laser em baixa intensidade na cicatrização
de defeitos ósseos preenchidos com vidrobioativo (Biogran®).
Estudo em animais**

**BAURU
2015**

GUILHERME SANTOS MOREIRA

**Avaliação do efeito do laser em baixa intensidade na cicatrização
de defeitos ósseos preenchidos com vidro bioativo (Biogran®).
Estudo em animais**

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

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

**BAURU
2015**

Moreira, Guilherme Santos

M813a Avaliação do efeito do laser em baixa intensidade na cicatrização de defeitos ósseos preenchidos com vidro bioativo (Biogran®). Estudo em animais./ Guilherme Santos Moreira. Bauru, 2015. p.:93, il. ; 30 cm.

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

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

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 037/2013
Data: 29/05/2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, cirurgiões-dentistas, que trilharam seus caminhos na odontologia suportados por princípios éticos e morais elevados, me dando a grata satisfação de poder compreender com o tempo de que essa profissão é uma arte de se relacionar com as pessoas, com o objetivo maior de proporcionar algo intocável que vai além da odontologia.

A Victória Santos Moreira, minha irmã, e a Marina Pedroso de Pádua, minha namorada, pelo sentimento verdadeiro, pela delicadeza e pelo perceptível olhar sincero de quem torce pelo sucesso. Dedico essa dissertação a vocês também.

Aos amigos da minha turma de mestrado, pela convivência diária e dias de intenso aprendizado. Dedico essa dissertação a todos vocês pela convivência, empenho e determinação em busca de algo comum entre nós. Formamos um grupo que soube dividir, ouvir e falar em horas oportunas. A maior lição que fica é a de que éramos onze alunos buscando uma coisa única: um conhecimento maior, apenas. A grata surpresa foi a amizade formada pelo reflexo de uma convivência sempre harmoniosa. Agradeço muito a vocês, e desejo de coração que todos tenham êxito nos objetivos que almejam.

Aos meus pacientes e alunos, de uma forma simples e sucinta, toda essa tentativa de obter mais conhecimento é para propor o melhor por vocês.

AGRADECIMENTOS

Por tornar possível a produção desta dissertação, meu primeiro e especial agradecimento a minha orientadora, Prof^a Dr^a Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida.

Obrigado pelos seis anos de orientação e pela convivência sempre solícita prestada. A minha evolução como cirurgião-dentista e professor certamente está relacionada às suas orientações quanto aos trabalhos de graduação, especialização e agora, mestrado. Todos eles, sobretudo esse último, só puderam ser realizados mediante um direcionamento de uma grande pessoa e profissional. Posso dizer com toda a certeza de que me senti sempre direcionado, não apenas por projetos ou aulas, mas por gestos nobres, humanos e sutis que sempre foram prestados sem necessariamente serem verbalizados. Claro que nunca foi fácil, exigiu esforço e dedicação de ambos os lados, mas tenha a certeza de que foi sempre agradável poder colaborar, aprender e ser o seu orientado. Muito obrigado professora Ana, de coração.

Agradeço também aos amigos Luís Augusto Esper e Michyele Sbrana, pessoas também fundamentais para a possibilidade de conclusão dessa obra. Competentes frente à profissão e de convívio sincero e harmonioso, foi sempre agradável estender os nossos laços profissionais aos pessoais, tornando-se com o passar do tempo um casal de grandes amigos. Muito obrigado.

Ao amigo Prof. Dr. Carlos dos Reis Pereira de Araújo e sua esposa, Prof.^a Maria Angélica Rehder de Araújo, pelas oportunidades dadas, pela confiança sempre prestada e pela amizade. Saibam que me espelho muito na história familiar e profissional de ambos. Agradeço ainda o aceite em meu convite para compor a banca examinadora que, para mim, é um ato de eterna gratidão. Muito obrigado, Prof. Carlos.

Ao amigo Prof. Dr. Renato Ferreira, pela convivência e aceite ao meu convite para compor a banca examinadora nesse momento profissional importante. Devo dizer também que sua atuação clínica e didática sempre me fizeram refletir sobre o meu atual caminho, me espelhando em profissionais como você. Conheço poucos tão completos. Muito obrigado, Prof. Renato.

À Faculdade de Odontologia de Bauru da 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.

Ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa de seu coordenador Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson, e de todo corpo docente do Departamento de Prótese pela contribuição na minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro pelos momentos de intenso aprendizado em aula e clínica. Obrigado pela contribuição na minha formação profissional. O senhor é uma referência para mim.

Ao Prof. Dr. Accácio Lins do Valle pela convivência harmoniosa em aula e clínica. Obrigado pela contribuição na minha formação profissional.

Ao amigo Prof. Dr. Renato de Freitas, pelos longos anos de ensinamentos, convivência e oportunidades dadas. Agradeço, sinceramente, por tudo que me foi proporcionado em odontologia. Muito obrigado, Prof. Renato.

Aos professores do departamento de prótese: Prof. Dr. Estevam Bonfante, Prof. Dr. Gérson Bonfante, Prof. Dr. José Henrique Rubo, Prof. Dr^a. Karin Hermana Neppelenbroek, Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Contí, Prof. Dr. Pedro César Garcia de Oliveira, Prof. Dr^a. Simone Soares, Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto, Prof. Dr. Wellington Cardoso Bonachela. Muito obrigado.

As funcionárias do Departamento de Prótese: Ana Cláudia Pereira, Cleide Vital Martins, Valquíria F. Nogueira, Deborah Andrea Riêra Blasca e da Pós-Graduação: Cleusa Gonçalves Leite, Hebe de Freitas Pereira.

Aos meus pais, João Moreira da Silva Neto e Cláudia Botelho Santos, pela sólida formação pessoal dada, alicerce para a construção de uma carreira profissional de princípios dignos, éticos e morais. Amo vocês.

A minha irmã, Victória Santos Moreira, pela mais próxima e sincera relação que duas pessoas de mesmo sangue podem ter. Mesmo distantes, de coração e pensamento próximos de um grande torcedor do seu sucesso. Te amo.

Ao meu avô, Guilherme Wolf Santos (in memoriam), pelos fundamentais ensinamentos para ser um homem simples e sensato, em que a valorização de princípios está sempre a frente do valor das coisas.

A minha namorada, melhor amiga e futura esposa, Marina Pedroso de Pádua, pela sua vocação em ser sincera, uma qualidade nobre nas pessoas. Obrigado pelo companheirismo e motivação, pelo amor e amizade. Obrigado por me mostrar o lado verdadeiro de amar e de querer estar junto para compor uma história de vida. O tamanho do valor de um homem se mede pela mulher que está ao seu lado. Há algum tempo reflito e vivo sob a ótica do conjunto, da união e da dupla. E saiba que é muito bom viver assim. Te amo!

A minha família Moreira que, que tanto me faz recordar de lindos e sinceros momentos familiares. Obrigado.

A minha família Santos, pela gratidão de poder conviver com pessoas puras. Em especial ao meu tio Luís Fernando Cintra e Luciana Santos Cintra, por 10 anos de suporte e convivência em Bauru.

Aos meus sogros Roberto de Pádua e Vera de Pádua, a minha cunhada Carolina de Pádua, cirurgiã-dentista, e ao meu cunhado Manuel Vieitez, por me abraçarem em Minas Gerais.

Ao meu amigo irmão Lucas Cambiaghi. Obrigado por 8 anos de convivência sincera. Torço muito por você.

Aos meus amigos de infância, Leonardo, Marcos, Gabriel, Caio, Plínio e Vitor. Vocês resumem o significado de amizade verdadeira.

Aos meus amigos da turma XLV, da Faculdade de Odontologia de Bauru, pelos maravilhosos quatro anos juntos, especialmente ao Patrick Alves e Bruno Nicolliello pela continuidade da convivência e amizade sincera em Bauru.

Aos meus amigos de especialização, do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, pelos produtivos e sinceros dois anos de convivência. Eduardo, Camila, Bruna, Ana Cristina, Fernanda, Guilherme, Bruno, Gustavo, Patrick, Mariana e Stefânia.

Aos meus amigos de mestrado, meu respeito e agradecimento eterno. Obrigado pelos dois anos de conhecimento transmitidos, pude aprender muito com cada um de vocês: Andréa, Ilana, Patrick, Fernanda, Thereza, Vinícius, Gustavo, Verena, e Oscar. Muito Obrigado.

Aos meus colegas do departamento de prótese, novos mestrandos e antigos doutorandos. Obrigado pela convivência.

Agradeço ao meu amigo e primeiro professor de implante Jorge Francisco Fiamengui Filho, por seu carisma e sabedoria. Obrigado por tudo.

Agradeço a convivência profissional e amizade de Juliana Hotta, Flávia Faria, Daniele Colaço, Camila Cardoso e Regiane Bixofis, Gustavo Momesso e Régis Melo. Obrigado.

Agradeço também ao companheirismo diário e a amizade formada a Márcia Esteves, Maísa Barrientos, Cíntia Barrientos, Adriana Tragante, Nelly Pereira e Isabela. Obrigado.

Agradeço aos meus professores do centrinho, em especial a Profª. Drª. Sueli Lobo Devides, pela sincera amizade e convivência, além de ser a mentora de uma grande oportunidade em minha vida. Muito Obrigado.

Agradeço ao querido amigo e mentor Daniel Brito, pelos ensinamentos dados sem mesmo havê-los iniciados. Vejo que podemos ser sempre mais se começarmos olhando pelo lado de dentro e sabendo aonde queremos chegar. Sua visão vai além do seu tempo. Muito obrigado.

Aos amigos do curso de Cone Morse da APCD, Augusto César e Fernanda Stancari pelos momentos de aprendizado e ensinamentos.

Aos amigos do curso de prótese sobre implante da Via Oral, Manoel Campos, Fernando Catalan e Rodrigo Gomes, bem como as fundamentais funcionárias Paula e Mara, pelos momentos de aprendizado e ensinamentos.

Obrigado também a quem não puder me dirigir aqui, mas saibam que tenho muita gratidão por todos que conviveram comigo nesses dez anos de Faculdade de Odontologia de Bauru. Muito obrigado a todos.

“Algumas pessoas querem que algo aconteça, outras desejam que aconteça, outras fazem acontecer.”

Michael Jordan

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do laser em baixa intensidade na cicatrização de defeitos ósseos preenchidos com vidro bioativo (VB), em animais. Foi criado um defeito ósseo de tamanho crítico (DTC) com 5 mm de diâmetro na calvária de 60 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus, albinos*, Wistar), pesando entre 250g e 300g. Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos (n=10), sendo: 1) Grupo C (controle), 2) Grupo L (laser), 3) Grupo OA (osso autógeno), 4) Grupo OAL (osso autógeno + laser), 5) Grupo VB (vidro bioativo), 6) Grupo VBL (vidro bioativo + laser). Os animais foram submetidos a eutanásia após 30 dias. As áreas de osso neoformado (AON) e as áreas de partículas remanescentes de vidro bioativo (APR) foram calculados em relação à área total (AT), em porcentagem. Para análise estatística dos dados utilizou-se o teste paramétrico ANOVA, seguido pelo teste Tukey ($p>0,05$). A maior média de AON foi encontrada no grupo L ($47,67 \pm 8,66$), seguido pelos grupos OAL ($30,98 \pm 16,59$) e VBL ($31,13 \pm 16,98$). Houve diferença estatisticamente significativa em relação ao AON entre o grupo C e os demais grupos com exceção da comparação com o grupo VB (Teste Tukey, $p>0,05$); entre os grupos L e VB quanto aos valores de AON (Teste Tukey, $p>0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa dos valores de AON entre o grupo OA e os demais grupos estudados (Teste Tukey, $p>0,05$), entre o grupo OAL e os grupos VB e VBL quanto aos valores de AON (Teste Tukey, $p>0,05$) e entre os grupos VB e VBL (Teste Tukey, $p>0,05$). A maior média de APR foi encontrada no grupo VB ($25,15 \pm 4,82$), seguido pelo grupo VBL ($17,06 \pm 9,01$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste t, $p>0,05$). O laser em baixa intensidade, com o protocolo de aplicação utilizado, não contribuiu para o aumento da área de neoformação óssea dos sítios preenchidos com vidro bioativo, no período avaliado.

Palavras-Chave: Transplante ósseo, Lasers, Ratos

ABSTRACT

Evaluation of the effect of low-level lasers on the healing of bone defects grafted with bioactive glass (Biogran®). Animal study

The objective of this study was to evaluate the effect of low-level lasers on the healing of bone defects grafted with bioactive glass (VB) in animals. A bone defect of critical size with 5mm in diameter was made in the skullcap of 60 male adult rats (*Rattus novergicus, albinos*, Winstar), weighing between 250g and 300g. The rats were divided randomly into 6 groups (n=10). Those being: 1) Group C (control); 2) Group L (laser); 3) Group OA (autogenous bone); 4) Group OAL (autogenous bone + Laser); 5) Group VB (bioactive glass); 6) Group VBL (bioactive glass + laser). The rats were euthanized after 30 days. The areas of new bone formation (AON) and the areas of remaining particles of bioactive glass (APR) were calculated in relation to the total area by percentage. For statistical analysis of the data, the parametric ANOVA test followed by the Tukey test ($p>0,05$) was used. The highest average AON was found in group L ($47,67 \pm 8,66$), followed by groups OAL ($30,98 \pm 16,59$) and VBL ($31,13 \pm 16,98$). There was a statistically significant difference regarding in AON between Group C and the other groups with the exception of comparison with Group VB (Tukey Test, $p>0,05$). There was also a statistically significant difference between the L and VB groups regarding the AON value (Tukey Test, $p>0,05$). There was no statistically significant difference of AON values between group OA and the other groups studied (Tukey Test, $p>0,05$); between group OAL and the groups VB and VBL regarding the AON value (Tukey Test, $p>0,05$); and between the VB and VBL groups (Tukey Test, $p>0,05$). The highest average of APR was found in group VB ($25,15 + 4,82$), followed by group VBL ($17,06 + 9,01$). There was no statistically significant difference between groups (teste t, $p>0,05$). The low-level laser, with the application protocol used, did not contribute to an increase in the new bone formation area of the sites grafted with bioactive glass in the assessed period of time.

Keywords: Bone transplantation. Lasers. Rats

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1- <i>Rattus norvegicus, albinus</i> , Wistar.....	43
Figura 2- A) Tricotomia e antissepsia da parte dorsal do crânio. B) Incisão semilunar da calvária.....	45
Figura 3- A) Retalho descolado e posicionado para visualização da calvária. B) Guia cirúrgico em posição para confecção do defeito e posicionamento das canaletas.....	45
Figura 4- A) Trefina em posição seguindo o guia cirúrgico para realização do defeito. B) Defeito realizado equidistantes 2mm das margens do amálgama.....	45
Figura 5- A) DTC preenchido com osso autógeno B) DTC preenchido com vidro bioativo.....	45
Figura 6- A) Laser de baixa intensidade TheraLase DMC®. B) Pontos de aplicação do laser de baixa intensidade.....	47
Figura 7- Figura 7 – Fotomicrografia de corte histológico, 2x H.E. A área total (AT) é delineada pela linha amarela e corresponde a área da calvária na qual o defeito cirúrgico foi criado. A altura da área total (X) corresponde a espessura do osso original da calota (Y). A área de osso neoformado (AON) está delineada pelas linhas vermelhas. A área de partícula remanescente (APR) está delimitada pelos desenhos azuis.....	49
Figura 8- A) Fotomicrografia do grupo C. Visão panorâmica do defeito cirúrgico. 4x, HE. B). Região central do defeito: presença de fibras colágenas paralelas e sem a presença e osso neoformado. 40x, TM.....	53
Figura 9- A) Fotomicrografia do grupo L. Visão panorâmica do defeito cirúrgico. 4x, HE. A espessura da calvária não é mantida B) Neoformação óssea em direção ao centro do defeito cirúrgico. 40x, TM.....	55

-
-
- Figura 10- A) Fotomicrografia do grupo OA. Visão panorâmica do defeito cirúrgico. 4x, HE. Nota-se a presença de tecido ósseo neoformado nas extremidades do defeito. B) Limite entre a partícula do enxerto autólogo (à direita do asterisco) e osso neoformado (à esquerda do asterisco)..... 57
- Figura 11- Fotomicrografia do grupo OAL. Visão panorâmica do defeito cirúrgico. 4x, HE. Presença de tecido ósseo neoformado nas margens do defeito e fibras colágenas orientando-se paralelamente. Partículas ósseas remanescentes com áreas de novo osso nas periferias. A manutenção da espessura da calvária não se manteve constante nesse grupo..... 59
- Figura 12- A) Fotomicrografia do grupo VB. Visão panorâmica do defeito cirúrgico e partículas remanescentes. Nota-se a manutenção da espessura original da calvária. 4x, HE. B) Partículas remanescentes interpostas por tecido conjuntivo organizado e fibroblastos na região. 10x, TM. C) Maior aumento retratando a organização colágena envolvendo as partículas remanescentes de VB. 20x, TM..... 61
- Figura 13- A) Fotomicrografia do grupo VBL. Visão panorâmica do defeito cirúrgico e partículas remanescentes. Nota-se a manutenção da espessura original da calvária. 4x, HE. B) Partículas remanescentes interpostas por tecido conjuntivo organizado e fibroblastos na região (*). 20x, TM. C) Partícula em maior aumento denotando a organização colágena (*) e invasão de células e tecido conjuntivo organizado para o interior da partícula (seta)..... 65
-
-

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média, desvio-padrão, Q25, mediana e Q75 dos valores de área de osso neoformado (AON) em %, de todos os grupos estudados.....	67
Tabela 2 - Comparação múltipla dos valores de AON entre o grupo C e os demais estudados (Teste de Tuckey $p < 0,05$).....	67
Tabela 3 - Comparação múltipla dos valores de AON entre o grupo L e os demais estudados (Teste de Tuckey $p < 0,05$).....	68
Tabela 4 - Comparação múltipla dos valores de AON entre o grupo OA e os demais estudados (Teste de Tuckey $p < 0,05$).....	68
Tabela 5 - Comparação múltipla dos valores de AON entre o grupo OAL e os demais estudados (Teste de Tuckey $p < 0,05$).....	68
Tabela 6 - Média, desvio-padrão, Q25, mediana e Q75 dos valores de área de partículas remanescentes (APR) em %, dos grupos VB e VBL.....	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Modelo experimental animal e defeito de tamanho crítico	23
2.2	Tecido e enxerto ósseo	26
2.3	Vidro bioativo	29
2.4	Laser.....	33
3	PROPOSIÇÃO	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1	Modelo experimental	43
4.2	Procedimento cirúrgico	43
4.3	Protocolo de aplicação do laser de baixa intensidade	47
4.4	Processamento tecidual	47
4.5	Análise histomorfométrica	48
4.6	Análise dos resultados.....	49
5	RESULTADOS	51
5.1	Análise histológica	53
5.2	Análise estatística.....	67
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXO	91

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O enxerto ósseo é o segundo procedimento de transplante tecidual mais utilizado no cotidiano clínico, sendo o sanguíneo de longe o mais comum. São realizados mais de 500.000 procedimentos de enxertia óssea anualmente nos Estados Unidos, e mais de 2.2 milhões em todo mundo (GIANNOUDIS et al., 2005), levando a gastos anuais de bilhões de dólares (DUCHEYNE, 1999).

A odontologia participa dessas estatísticas em situações clínicas nas quais há necessidade de reconstrução dos defeitos ósseos ou teciduais, desencadeados por traumas ou insucessos cirúrgicos anteriores, processos inflamatórios, infecciosos e relacionado a limitações anatômicas (BURG, 2000; MARDAS et al., 2008; MCALLISTER; HAGHIGHAT, 2007).

A perda óssea ocasionada por essas alterações cria um ambiente desfavorável para reabilitação da área edêntula, como por exemplo, para instalação de um implante osseointegrável na posição tridimensional ideal, podendo comprometer a estética e a função da reabilitação protética (HOEXTER, 2002; MCALLISTER; HAGHIGHAT, 2007). Para atender a essas possíveis demandas, a perspectiva em cima dos estudos sobre biomateriais vem aumentando sob o ponto de vista científico e de sua aplicabilidade clínica, o que poderá promover melhoria em tratamentos e intervenções que utilizam esses materiais como terapia de reposição dos tecidos perdidos (ABBOELSAAD et al., 2008).

A bioengenharia compõe uma área de pesquisa importante que consiste na utilização de biomateriais como matrizes de suporte de células viáveis, capazes de regenerar-se ou repara-se em tecidos vivos. Assim, tecidos podem ser reparados a partir de culturas realizadas das próprias células do paciente, eventualmente sem deixar resíduos do material artificial, por serem biodegradáveis. Assim, respostas celulares que normalmente só ocorrem naturalmente, podem ser induzidas e guiadas, acelerando os processos de cura e/ou reabilitação (LANGER, 2004).

A regeneração óssea guiada, uma área da engenharia de tecidos, tem como princípio de cicatrização a disputa biológica entre células do tecido conjuntivo e

células ósseas (BUSER et al., 1993), pode ser utilizada pelo clínico para otimizar ou criar uma situação favorável para uma reabilitação oral cirúrgico-protética, ou ainda para recuperar uma região acometida periodontalmente. Considerando as várias modalidades de tratamentos reabilitadores ou de manutenção periodontal, sabe-se que a harmonia entre tecidos moles e duros dita a eficácia estética e funcional ao final do tratamento. (MCALLISTER; HAGHIGHAT, 2007).

Os estudos de bioengenharia tecidual que visam propor um material substituto ideal há décadas se mostram presentes no circuito científico. Um biomaterial é um composto de substâncias, naturais ou sintéticas, que visam substituir, aumentar ou tratar alterações biológicas. Para ser considerado eficaz, é importante que contenha algumas propriedades biológicas como bioatividade, biocompatibilidade, osteogênese, osteocondução e osteoindução (GIANNOUDIS et al., 2005; BURG, 2000; PILLIAR, 2001), apresentando-se com denominações distintas conforme sua origem: alógeno, xenógeno ou aloplástico (MARDAS et al., 2008).

O osso autógeno, em bloco ou particulado, por possuir as características acima citadas, tem sido considerado como um material de padrão ouro para cirurgias regenerativas e reconstrutivas. Porém, durante o processo de remoção do enxerto há limitações quanto à quantidade de material doador disponível, o que pode acarretar em aumentada morbidade pós-cirúrgica, outro fato a ser considerado é a manutenção da quantidade óssea após o período de cicatrização (HALLMAN; THOR, 2008; NKENKE, 2001), além de apresentarem taxas de até 30% de complicações, independente da área doadora selecionada (PORTER et al., 2009).

Os recentes avanços na bioengenharia propõem a utilização de substitutos ósseos como métodos alternativos ou complementares ao osso autógeno, justificado pela disponibilidade ilimitada e por dispensarem o procedimento cirúrgico de um sítio doador (TOPAZIAN et al., 1971; NORTON; WILSON, 2002).

Há uma grande disponibilidade de materiais de enxertia no mercado, mas o substituto ideal ao osso autógeno ainda não foi identificado (HALLMAN; THOR, 2008), sobretudo pelo fato de não apresentarem osteogenia, propriedade inerente

ao osso autógeno, porém aptos a oferecerem capacidade de osteocondução efetiva e osteoindução variável (de alta a nenhuma) (CALORI et al., 2011).

O vidro bioativo é um material sintético, aloplástico, a base de cálcio, fosfato, e dióxido de silício (NAYER, 2009), agregados aos íons bioativos, que promovem uma similaridade com o osso humano. Foi descoberto por Larry Hench no início da década de 70, e pode ser considerado um agente de atração para o desenvolvimento de um potencial regenerativo em sítios cirúrgicos comprometidos (POTIJANYAKUL et al., 2010).

Grânulos de vidro bioativo têm sido utilizados como um substituto ósseo nas atividades médicas e odontológicas, sendo, nesta última, um promissor material de eleição para procedimentos como regeneração tecidual guiada em defeitos periodontais, levantamento de seio maxilar, manutenção da espessura do rebordo em alvéolos pós-extração e preenchimento de "gaps" em leitos de implantes imediatos (VEI Setal., 2006).

Alguns estudos demonstraram que as partículas de vidro bioativo são potencialmente osteocondutivas, isto é, promovem um arcabouço favorável para que o reparo e crescimento do tecido ósseo sejam possíveis (FURUSAWA et al., 1998; FROUM et al., 2002). Além da osteocondução, esse biomaterial pode apresentar uma outra forma de bioatividade, denominada osteoestimulação, que consiste na capacidade biológica que ocorre no meio interno da partícula do vidro bioativo, onde haveria uma condição química e biológica favorável para a formação óssea, independente da formação óssea externa à partícula cerâmica (SCHEPERS et al., 1991; FURUSAWA et al., 1998). Células mesenquimais indiferenciadas penetrariam nas partículas de vidro erodidas e seriam estimuladas pelo meio interno a diferenciarem-se em osteoblastos.

Outra técnica que tem sido utilizada na cicatrização óssea na prática odontológica é o laser em baixa intensidade, um acrônimo de "Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação", que na última década tem apresentado inúmeras citações em trabalhos de pesquisa na área (DÖRTBUDAK, 2002; SILVA, 2006; PINHEIRO; GERBI, 2006; OBRADOVIC, 2009; BASHARDOUST, 2010; ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; ESPER, 2015).

A estimulação do sítio cirúrgico com laser em baixa intensidade ativa os osteoblastos, favorece a osteosíntese, diminui a atividade osteoclástica e estimula o fluxo sanguíneo. Essas modificações das condições ambientais parecem tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* (SILVA, 2006; PINHEIRO; GERBI, 2006).

Em tecidos duros, as irradiações com laser em baixa intensidade aumentam significativamente o número de osteócitos viáveis na região irradiada. Em defeitos ósseos, a aplicação do laser revelou alto potencial para a formação de novo osso (DÖRTBUDAK, 2002).

Ao associar-se o laser em baixa intensidade ao vidro bioativo confirmou-se o efeito positivo na capacidade de formação de novo osso e diminuição do tempo de cicatrização em sítios de implantes. Em defeitos periodontais infra ósseos e tratados com vidro bioativo associado ao laser em baixa demonstrou acelerar a formação e mineralização de novo osso, resultando em melhorias significativas na condição periodontal e diminuição do tempo de cicatrização (ABOELSAAD, 2009).

Alguns estudos tem demonstrado que o laser possui um efeito positivo na cicatrização óssea tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* (PINHEIRO, 2003; STEIN, 2005; CUNHA et al., 2014; ALMEIDA et al., 2014; ESPER, 2015), aumenta a produção de fatores de crescimento fibroblásticos de fibroblastos gengivais humanos (SAYGUN et al., 2008). Entretanto, outros trabalhos não encontraram qualquer efeito do laser no reparo de tecidos moles ou mineralizados (LUGAR et al., 1998; ANNEROTH et al., 1998).

A grande variação de resultados quanto ao efeito do laser na cicatrização óssea se deve as diferenças metodológicas dos estudos principalmente quanto a dose, número de sessões, modelo experimental (animais, humanos), tamanho do defeito realizado e material de preenchimento.

Na literatura não há trabalhos que avaliem a efetividade de uma única aplicação (uma sessão) do laser de baixa intensidade na cicatrização de defeitos ósseos preenchidos com vidro bioativo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL E DEFEITO DE TAMANHO CRÍTICO

A falta de um modelo experimental padrão, via de regra prejudica a comparação de resultados quando diferentes substitutos ósseos são testados. Na ciência, há muitos anos, acontece uma busca para a identificação desse modelo padronizado que possa possibilitar testes de comparação eficazes (BOSCH et al., 1998).

Alguns fatores biológicos, independentemente do animal selecionado para uma suposta pesquisa, devem ser levados em consideração durante a avaliação do resultado obtido, como por exemplo: o nível de dificuldade de manuseio desse animal, sua idade, disponibilidade óssea adequada, tamanho, disponibilidade do defeito e sua localização anatômica e ainda permitir que possa haver um eficaz controle posterior dos resultados obtidos com a regeneração óssea, tanto clínico quanto histológico e/ou radiográfico (FRAME et al., 1980; BOSH et al., 1998; TAKAGI; URIST, 1982)

Para pesquisas nos quais a regeneração óssea é o objeto de estudo, alguns modelos tem sido propostos: em fêmur de ratos (BROWN et al., 2011) e de coelhos (DOMINIAK et al., 2012), em mandíbula de cães (CALHOUN et al., 1965), em tíbia de ratos (NAGATA et al., 2005) e em calvária de ratos (DEPORTER et al., 1988, VERNA et al., 2002, NAGATA et al., 2010b; MOKBEL et al., 2012, CUNHA et al., 2014; ALMEIDA et al., 2014; ESPER, 2015)

Grande parte das pesquisas realizadas em áreas básicas, são utilizados animais de laboratório de pequeno porte, como ratos, camundongos, hamsters e coelhos, totalizando quase 90% do total das espécies de laboratório. Animais de grande porte, como cachorros, macacos e ovelhas, participam de uma porcentagem menor quando comparados aos animais citados anteriormente, por apresentarem um manuseio de sedação e clínico mais complexos e um custo mais elevado (BOSCH et al., 1998; MENDES et al., 2001). Por outro lado, em animais maiores, visto a sua disponibilidade óssea, a possibilidade de criação de defeitos maiores e

múltiplos e a sua relação com implantes adjacentes também instalados, podem apresentar maiores facilidades aos trabalhos operacionais (FRAME, 1980b).

A utilização de animais de pequeno porte, ainda que usado em maior proporção como supracitado, apresentam uma capacidade cicatricial potencialmente aumentada quando comparada a outros animais de grande porte (ENNEKING et al., 1975). Outro fator é relacionado ao tamanho e a espessura dos ossos que, por serem menores, pode trazer ao cientista possibilidades aumentadas de fratura de ossos longos como o fêmur ou rompimento das condições fisiológicas da dura-máter na calvária, em situações nas quais ratos de laboratório são selecionados (FRAME, 1980b).

Para indicar a utilização de um substituto ósseo em humanos, estudos rigorosos em animais e consensos entre Academias são realizados. Em 1986, Schmitz e Hollinger (1986) introduziram o conceito de “defeito de tamanho crítico” em suas pesquisas. Segundo eles, para o defeito obter características comparativas entre os diversos biomateriais empregados na bioengenharia tecidual, deveria obter um dado tamanho mínimo para que o mesmo não permitisse que sua regeneração fosse completa ao longo do tempo de vida natural do animal em condições fisiológicas normais. Hollinger e Kleinschmidt (1990) corroboram com os conceitos dos autores anteriores, afirmando que se o fechamento completo de um defeito não ocorrer em um ano, é muito provável que após esse tempo a cura completa jamais ocorrerá. Recentemente Gosain et al. (2000) definiram defeito de tamanho crítico como sendo um defeito com tamanho que não cicatrizará completamente durante o período de duração do estudo.

Seguindo esse raciocínio, alguns autores propuseram que o diâmetro do defeito em ratos poderia variar entre 2 e 9mm, e que sua capacidade da neoformação aconteceria às custas desses tamanhos (FREEMAN; TURNBULL, 1973; MULLIKEN; GLOWACKI, 1981; TAKAGI; URIST, 1982; BUSCH et al., 1996).

Freeman e Turnbull (1973) propuseram um defeito de 2 mm de diâmetro e observaram pequena formação óssea após 12 semanas, confirmando os achados de Herold et al. (1974), embora avaliados após 7 semanas. Takagi e Urist (1982), descreveram seus estudos utilizando um defeito de 8 mm e também observaram o

não fechamento da ferida em um período até 12 semanas. Bosch et al (1988), estudaram os defeitos de 5 mm de diâmetro em calvárias de ratos Wistar, modelo do atual estudo. Os autores determinaram essas dimensões devido a certas limitações dos defeitos maiores como a inclusão da sutura sagital no defeito e o consequente risco de hemorragia. Após 12 meses do procedimento cirúrgico e observação cicatricial do coágulo, os autores puderam observar que em nenhum dos defeitos realizados houve sinais de regeneração óssea efetiva e espontânea, revelando que defeitos de tamanho crítico de 5 mm, poderiam ser um modelo experimental adequado para avaliação da capacidade regenerativa dos biomateriais na cicatrização de defeitos ósseos.

A divergência de resultados encontrados poderia ser explicada pelas diferenças entre os desenhos de brocas trefinas utilizadas e as inúmeras raças de ratos disponíveis (BUSCH et al., 1996). Quando a calvária é região anatômica elegida para estudo, outros fatores como a preservação trans-cirúrgica da dura-máter e do periósteo (BOSCH et al., 1998), a garantia de ausência de condições infecciosas (DEPORTER et al., 1988), a estabilização da sutura (BOSCH et al., 1998) e a resposta do hospedeiro, podem levar a resultados incertos dentro de grupos de um mesmo trabalho científico (DEPORTER et al., 1988). Uma recente revisão sistemática consideraram que defeitos com 5 mm de diâmetro em calvária de ratos são de tamanho crítico (VAJGEL et al., 2014).

A histomorfometria é uma técnica histológica na qual quantifica-se os diferentes tecidos presentes em uma dada área de um corte histológico, demonstrando ser a principal metodologia utilizada para avaliação dos substitutos ósseos empregados em sítios receptores diversos (GAMA et al., 2007; FURLANETO et al., 2007; ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; ESPER 2015).

Em alguns trabalhos, descreveu-se o uso de radiografias para avaliação do resultado regenerativo (MARZOUK et al., 2007; PRYOR et al., 2005), porém observou-se discordância de resultados quando comparados aos resultados histomorfométricos, considerado padrão-ouro (PRYOR et al., 2006).

2.2 TECIDO E ENXERTO ÓSSEO

O enxerto ósseo é um procedimento comum na área da saúde em situações nas quais membros ou parte deles precisam ser reconstruídos. Na odontologia, selecionamos essa técnica em casos onde a reconstrução é indicada seja por motivos traumáticos e/ou reabilitadores (JENSEN et al., 2012).

O tecido ósseo é constituído por uma matriz orgânica de colágeno tipo I, contendo proteoglicanas de baixo peso molecular e proteínas não colágenas correspondentes a 25% do seu peso. Os cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) correspondem a 65% da parte mineral do tecido ósseo e é o componente que confere sua rigidez. A água está presente em 10% da sua constituição. Todos esses componentes associados a suas funções, caracterizam o tecido ósseo como uma estrutura altamente especializada (OLIVEIRA et al., 1999).

Ao realizar uma técnica de enxertia o profissional busca a regeneração óssea, uma nomenclatura dada para a cicatrização de uma região de defeito que poderá ser restabelecida de maneira fisiológica e sem perda de função, mantendo-se o enxerto integrado e viável biologicamente.

A regeneração óssea guiada, por sua vez, é definida como uma renovação óssea em áreas de defeito, porém controlada e suportada pelos princípios de osteogênese, osteoindução e/ou osteocondução, baseando-se na hipótese de que, durante o processo cicatricial, diferentes tipos celulares apresentam potenciais diferentes de migração para o local da ferida, indicando o uso de barreiras mecânicas em alguns casos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O processo regenerativo é integrante das características fisiológicas do tecido ósseo como parte do processo de reparo, seja por reconstrução de deformidades ocasionais ou pelo *turnover* ósseo inerente ao processo remodelador. Em casos traumáticos ou em defeitos criados cirurgicamente, o coágulo formado imediatamente no local é o substrato inicial necessário para que a regeneração se inicie (CRUZ, 2006A; DIMITRIOU et al., 2011).

Esses processos fisiológicos ocorrem pelo equilíbrio entre a remoção de tecido danificado, pelos osteoclastos, e a deposição de tecido ósseo sadio, pelos

osteoblastos, diariamente, sendo que em 10 anos todo o tecido ósseo de um organismo humano é renovado. Em casos onde há fratura, seja por motivo acidental ou provocado, essa homeostase é interrompida, atraindo células viáveis para a região comprometida que iniciarão um processo regenerativo para devolução das características estruturais e fisiológicas normais (MANALOGAS, 2000; URIST, 2009).

Os enxertos ósseos, dependendo do seu lugar de origem, podem apresentar uma característica mais cortical ou medular. Essa peculiaridade estrutural está diretamente relacionada ao seu local de origem e conseqüentemente promovem respostas biológicas distintas. O osso cortical apresenta uma forma mais compacta e possui um potencial osteogênico menor que o osso medular, porém é mais resistente (HEIPLE, 1987). O osso cortical está mais associado a funções estruturais e protetoras, enquanto o osso medular interage mais com as funções metabólicas, sobretudo nos espaço medulares, onde a medula óssea vermelha produz células sanguíneas a partir de células mesenquimais indiferenciadas (MARX, 1998).

Tanto o osso compacto como o osso medular, são envolvidos superficialmente por uma camada de tecido conjuntivo, uma estrutura importante presente que, na sua porção externa denomina-se periósteo e em sua porção interna, endosteio. Essa estrutura apresenta alta capacidade de desempenhar a osteogênese pela presença das células osteoprogenitoras. Em situações cirúrgicas a sua preservação e o seu correto manejo podem favorecer o resultado cicatricial positivo da ferida (JUNQUEIRA, 2005).

No contexto biodinâmico do tecido ósseo, existem três elementos celulares fundamentais que organizam os processos remodeladores e/ou reparadores. Os osteoblastos são células mononucleares, oriundas a partir de células osteoprogenitoras e participam da osteogênese, sintetizando e secretando matriz orgânica. São células responsáveis pela síntese e maturação da matriz óssea, onde ficaram aprisionados os osteócitos. Essas células, que são células achatadas e estão armazenadas dentro dessa matriz, são uma linhagem de osteoblastos que sofreram um processo de diferenciação e estabeleceram contatos entre outros osteócitos através de prolongamentos citoplasmáticos, por onde passam pequenas moléculas e íons, favorecendo a manutenção da vitalidade do tecido ósseo. Os

osteoclastos por sua vez são células de origem hematopoiética, que interagem com os osteoblastos ao longo da vida reabsorvendo o osso a medida que fatores são depositados e armazenados na matriz e ou secretados localmente, induzindo a diferenciação dos osteoclastos e sua ativação para garantir a remodelação (BOYNE et al., 2012; RODAN, 1981).

Segundo Boyne (1970), o melhor material de enxerto é o autógeno medular particulado, devido à sobrevivência de algumas células viáveis com capacidade osteogênica, antigenicidade e completa histocompatibilidade. Esse trabalho confirma o que já é consagrado em literatura como *gold standard* quando nos referimos as capacidades bioativas e biocompatíveis inerentes a essa modalidade de enxertia, sendo gradativamente reabsorvidas e substituídas por novo tecido ósseo. Herford e Dean (2011) sugerem que os sítios doadores podem ser intraorais ou extraorais, as despesas do tamanho da área receptora e da geometria do defeito, além da quantidade óssea requerida que, em ambas situações, apresentam como as maiores limitações dessa técnica, acarretando em dois sítios de atuação e maior morbidade cirúrgica (HALLMAN; THOR, 2008; NKENKE, 2001).

A propriedade osteoindutora desse material de enxertia está associada a presença de proteínas morfogenéticas ósseas, as BMPs. Essas células são glicoproteínas responsáveis pelo recrutamento de células osteoprogenitoras para os locais de formação óssea (SOMMERNAN et al., 1983). Para Bowers e Reddi (1992), as BMPs são proteínas encontradas em altas concentrações no tecido ósseo especialmente em sua porção medular, e são consideradas as responsáveis pela habilidade indutiva e regenerativa. Tais propriedades conferem ao enxerto ósseo autógeno papel fundamental na formação de osso com qualidade adequada para receber implantes (WHEELER et al., 1998).

A característica osteocondutora do enxerto autógeno esta associada a sua capacidade de permitir um arcabouço tridimensional favorável para organização de células osteoindutivas e osteogênicas com potencial para formação de novo osso (INTINI et al., 2008)

Quanto a topografia do enxerto autógeno no momento cirúrgico, pode apresentar-se em bloco ou particulado. A forma de apresentação do enxerto não

determina a técnica para sua utilização, visto que suas indicações estão associadas a morfologia do defeito ósseo a ser preenchido e as precisas indicações no contexto reabilitador, ficando a critério do cirurgião a escolha e manuseio da técnica (BEZERRA; LENHARO, 2002).

2.3 VIDRO BIOATIVO

Em 1967, Larry L. Hench, um engenheiro especializado em cerâmica, conheceu um coronel que combateu na guerra do Vietnã, e viu milhares de soldados ter braços e pernas amputadas devido a implantações mal sucedidas, pela inviabilidade biológica dos metais e plásticos da época. O cientista, então da Universidade da Flórida, iniciou um trabalho em 1969 e dois meses após apresentou um vidro que ligava-se tão bem aos ossos de ratos, que os pesquisadores não conseguiam separá-los. A hipótese na ocasião era de que o vidro que Hench havia desenvolvido atraía as células ósseas. Hench havia descoberto uma nova classe de biomateriais: a cerâmica bioativa (LAMA, 2003).

Os materiais cerâmicos têm sido utilizados na área da saúde desde essa época, para reparar ou reconstruir partes danificadas do sistema esquelético. As chamadas biocerâmicas foram usadas para promover funções não só estruturais, mas também biológicas, reproduzindo, sempre que possível, a estrutura natural obtida em sistemas vivos (HENCH 1986, 1998).

Em 1972, estudou-se o comportamento histoquímico do biovidro, mais especificamente nas suas interfaces quando apresentada uma ligação ao osso. Verificou-se nessas condições, as implantações desse material cerâmico eram ligados ao osso por uma fina camada que assemelhava-se a um cimento. Descobriu-se posteriormente que essa fina estrutura era rica em sílica, cálcio e fosfato. Puderam ainda evidenciar um crescimento de novo osso nas regiões adjacentes a superfície das cerâmicas posicionadas (HENCH et al., 1973)

Os componentes básicos da maioria dos biovidros são SiO₂ (Dióxido de Silício), Na₂O (Óxido de Sódio), CaO (Óxido de Cálcio) e P₂O₅ (Pentóxido de Difósforo). A denominação de cerâmica de vidro é dada pela presença do silício em

sua composição, componente presente no vidro industrial (Hench, 1993), e o termo bioativo que o acompanha é definido como um material que extrai uma resposta biológica específica na sua interface, o que resulta na formação de uma união entre o tecido e o material. Sua composição é dividida em 45% de SiO_2 , 24,5% de CaO , 24,5% de Na_2O e 6% de P205 (HENCH, 1998)

Com relação ao mecanismo de ação desse material, observa-se uma forte união mecânica entre o vidro bioativo e o tecido ósseo, resultantes de uma corrosão da superfície dos grânulos cerâmicos que quando expostos aos fluidos tissulares formam uma película gelatinosa superficial rica em sílica. Essa camada, que também apresenta íons cálcio e fosfato, é biologicamente ativa e promove uma interface de união com o tecido ósseo por apresentar aspectos químico e estruturais semelhantes a fase mineral do osso normal, reconhecida pelo organismo portanto com algo “não sintético”. Essa característica inerte do biovidro faz com que os osteoblastos reconheçam a superfície como um lugar em potencial para depósito de fibras colágenas, que se incorporam ao gel de sílica. A união das fibras ao vidro bioativo podem ser comparadas aos da inserção conjuntiva, estrutura presente no periodonto de proteção. Com esse processo cíclico e contínuo a superfície do gel estabiliza-se e as crateras formadas em sua superfície paralisam. Internamente a esses espaços, são produzidos cristais mineralizados que funcionam como uma ponte entre a superfície do vidro e o osso maduro (HENCH, 1998; HENCH; PASCHALL, 1974; HENCH; WILSON, 1984)

Dentre suas propriedades biológicas, a osteocondução está presente nas cerâmicas de vidro bioativo promovendo um arcabouço favorável para o reparo ósseo. Além dessa, descreveu-se após investigações uma outra propriedade peculiar a esse biomaterial, denominada de osteoestimulação, cujo mecanismo funcionaria da seguinte maneira: ao observar partículas de cerâmica implantadas em sítios de regeneração. Shepers et al., em 1991, observaram as crateras da porção interna do grânulo assemelhava-se biologicamente a um tecido ósseo, porém não era unida ao osso da porção externa da partícula, situação semelhante a proposta por Hench e colaboradores, em 1984. O primeiro autor, no entanto, complementou os achados de Hench a respeito do gel superficial rico em sílica, afirmando que células fagocitárias penetrariam e permeariam o gel pelas fraturas da camada de cálcio e fósforo, e o absorveriam. Células mesenquimais se aproveitariam dessas fissuras e

penetrariam no interior do grânulo, onde encontrariam um ambiente biológico semelhante ao tecido ósseo, o que desencadearia sua diferenciação em osteoblastos. Já no interior dos grânulos, estruturas ósseas individuais seriam formadas, porém estimuladas de dentro para fora e independentes na estimulação osteoblástica do osso adjacente e nativo. Essas afirmações puderam ser comprovadas posteriormente por outros autores (FURUSAWA et al., 1998; MACNEILL, 1999; NORTON; WILSON, 2002; FROUM et al., 2002)

Um estudo idealizado por Johnson et al., em 1997, propuseram determinar as condições da interface entre um vidro bioativo, implantes de titânio e tecido ósseo de coelho. Os animais receberam quatro implantes de 3,3x8mm de titânio: em um não criaram defeito ósseo e em três criaram defeitos ósseos periféricos que simulariam Gaps. Preencheram dois defeitos com vidro e um não foi preenchido (controle). Os resultados em 1, 2, 3 e 6 semanas mostraram que os defeitos preenchidos com BV apresentaram maior formação óssea e uma característica mais densa, com melhor adaptação à superfície do implante.

Tadjoedin et al. (2000), propuseram uma avaliação do potencial regenerativo do vidro bioativo em cirurgias reconstrutivas para elevação do soalho do seio maxilar. Dez pacientes edêntulos foram selecionados e em um seio maxilar, o grupo teste, usaram uma mistura de 50% Biogran e 50% osso autógeno e no grupo controle, apenas osso autógeno. Após 16 meses, o material foi avaliado histomorfometricamente, e os autores concluíram que a combinação de materiais apresentou um resultado mais favorável do que apenas osso autógeno, e ainda que após esse período não havia mais sinais histológicos das partículas do biomaterial.

Ainda com relação ao seu tempo de reabsorção pelo organismo, Stavropoulos et al. (2003), constataram que o processo de reabsorção do vidro bioativo variou de 6 a 24 meses em ratos, confirmando um trabalho de Macneill et al. (1999), que ainda puderam observar que conforme a reabsorção ocorria, era dado lugar a novo tecido ósseo.

Um estudo avaliou a resposta cicatricial histológica de duas marcas de vidros bioativos (MACEDO et al., 2014). Dezesesseis ratos foram divididos em dois grupos, no qual um receberia Perioglas e outro Biogran. Realizou-se um defeito na tíbia dos

animais com uma broca trefina de 3mm e preencheram com os materiais. Após 07, 14, 30 e 60 dias, realizaram a eutanásia e observaram histologicamente os seguintes resultados: Aos 07 e 14 dias ambos os grupos apresentaram tecidos ósseos neoformados. Já aos 30 e 60 dias puderam observar um osso mais maduro permeado por partículas de vidro. Os autores concluíram que, independente da marca e de suas granulações, ambos os materiais promoveram um preenchimento ósseo satisfatório, exercendo portanto sua característica osteocondutiva com sucesso.

Também comparou-se o vidro bioativo a um osso bovino poroso mineral, e foram encontrados resultados controversos. Schmitt et al. (1997) observaram, embasados em um estudo histomorfométrico em rádio de coelhos, que houve maior regeneração óssea quando o osso mineral foi empregado. Já, Carvalho et al. (2002) puderam concluir que ambos os materiais levaram a um reparo completo dos sítios cirúrgicos criados em tíbias de ratos, Ainda em um outro estudo histológico em mandíbula de ratos, nenhum dos dois materiais mostrou-se eficaz como material de preenchimento em técnicas de ROG (STAVROPOULOS et al., 2003).

Ainda comparando o vidro a demais substitutos ósseos, Chan et al. (2002) obtiveram resultados similares para osso autógeno, controle (coágulo sanguíneo) e vidro bioativo. O autor ainda ressalta que as propriedades biológicas do osso autógeno o torna substituto ósseo ideal, mas que o fato do biovidro ter apresentar resposta biológica equivalente o faz um material interessante.

Em humanos, a literatura também apresenta bons resultados da utilização do vidro bioativo. Em um estudo de Schepers et al. (1993a), observou 87 pacientes e 106 sítios onde foram utilizados as partículas de vidro bioativo. Os ambientes estudados seriam alvéolos pós extração e áreas pós apicectomia. Ao longo de um período de acompanhamento de dois anos, resultados clínicos e radiográficos positivos quanto a efetividade da cicatrização óssea puderam ser observados. Esses achados confirmam outros trabalhos em humanos que avaliaram as situações clínicas nas quais a implantação de algum biomaterial era indicada para manutenção as características anatômicas e fisiológicas normais (NOVAES JUNIOR et al., 2002; ROSENBERG et al., 2000)

Camargo et al (2000) propôs a utilização do vidro bioativo (Biogran®) em alvéolos de extração, adicionado um barreira de sulfato de cálcio. Após a observação de 16 pacientes, verificou que a biocompatibilidade do material em estudo frente aos tecidos bucais, além dos resultados expressivos quanto a manutenção clínica das medidas do rebordo alveolar, porém sem resultado histológico devido a origem humana de suas amostras.

O vidro bioativo parece apresentar, segundo demonstrado em literatura, características biológicas peculiares e de resultados científicos favoráveis tanto em animais quanto em humanos, confirmando ser um interessante objeto de estudo em sítios regenerativos.

2.4 LASER

Miserendino e Pick (1995) propuseram que o Laser, um acrônimo de “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação”, possui características únicas que a diferenciam da luz comum, sendo introduzido como uma alternativa terapêutica há aproximadamente 45 anos (BASHARDOUST, 2010; OBRADOVIC, 2009).

As inovações tecnológicas têm permitido o desenvolvimento de lasers apropriados para cada área da saúde, proporcionando aplicações específicas a partir de diferentes meios ativos. Podem ser utilizados em alta intensidade, rompendo ou modificando permanentemente os tecidos ou em baixa intensidade, apenas como modulador das respostas celulares (ROYNESDAL et al., 1993).

A American National Standards Institute, ANSI, classifica o laser de acordo com a sua periculosidade, baseado na potência de saída e pelo seu respectivo comprimento de onda. O de Classe 1, considerado sem perigo, a potência não é percebida a olho nu. O laser de Classe 2 já é considerado perigoso caso haja um direcionamento a olho nu ao feixe ascendente de luz. O de Classe 3 apresenta potência média e também podem ser perigosos quando focalizados pelos olhos através de lentes ópticas. Por fim, o de Classe 4, de alta potência e perigoso, é o

laser que pode causar danos oculares tanto pelo contato direto quando pelo seu reflexo (DAMANTE et al., 2004).

Os componentes estruturais de um laser compreendem uma cavidade óptica ressonante, que é uma câmara onde está o meio ativo, que possui forma variada e espelhos que amplificam seus efeitos e refletem a luz de maneira total ou parcial. O meio ativo é o que determina o comprimento de onda da luz emitida e pode ser constituído por diversos materiais: gasosos, isolantes dopados, semicondutores, corantes orgânicos dissolvidos em solvente líquidos e excímeros. Complementando a estrutura do laser, o mecanismo de bombeamento é a estrutura responsável por excitar os elétrons do meio ativo (MISERENDINO; PINK, 1995).

Cada onda de luz possui a mesma cor, ou seja, o mesmo comprimento de onda, o que lhe confere uma característica de monocromaticidade. Outra propriedade do laser é a coerência, no qual é explicado pela organização dos feixes que se propagam na mesma direção do tempo, espaço e frequência. O laser também possui uma capacidade de propagação unidirecional da luz, não havendo divergência de seus feixes (MISERENDINO; PINK, 1995).

O laser de dióxido de carbono (CO₂), do tipo gasoso, tem sido usado para cirurgias de tecido mole, assim como o laser de Nd:YAG (ítrio e alumínio dopado com neodímio) que tem aplicações para tecidos moles e duros (MYERS; MCDANIEL, 1991), além de participação na Endodontia, como na esterilização e no esvaziamento dos canais radiculares pela introdução de uma fibra que, quando irradiada por energia laser, vaporiza e desinfeta o canal, eliminando o risco de dano apical, confirmando os achados de Eduardo e Gouw-Soares, 2001, que também demonstraram a eficácia do laser como método alternativo para otimização da resposta clínica, tanto em baixa quanto em alta intensidade. Em Periodontia, Chan e Lai (2003) expuseram culturas de patógenos periodontais à radiações aos lasers de He-Ne (mistura de gases hélio e neônio) e laser diodo. O grupo controle, não irradiado, foi corado com azul de metileno. Os resultados indicaram que a exposição ao laser diodo na presença do fotossensibilizador indicou a melhor fotodinâmico-terapia eliminando, nessas condições, uma quantidade significativa de patógenos periodontais e demonstrando ser um excelente coadjuvante ao debridamento mecânico.

O laser de baixa intensidade tem tido utilidade clínica para o tratamento de alterações temporomandibulares (CONTI, 1997), estimulação da osteogênese (DASILVA; CAMILLI, 2006), auxílio nos processos de reparo ósseo (GARCIA et al., 2012), preparo de cavidades em dentística (ARMEGOL et al., 2000), bioestimulação transcirúrgica do enxerto ósseo autógeno (WEBER et al., 2006; ALMEIDA et al., 2014) e atenuação de processos dolorosos (BRADLEY, 2002).

Com relação aos mecanismos de ação do laser aos tecidos, atua na cadeia respiratória e em nível celular. Tina Karu (1989) propôs a teoria de que os lasers que emitem luz visível induzem ativação da síntese de enzimas, atingindo inicialmente os lisossomos e as mitocôndrias das células. A radiação infravermelha por sua vez, não é absorvida por essas organelas celulares, apenas pelas membranas, que apresentam resposta ao estímulo luminoso e exacerbam sua troca iônica, traduzindo em aumento de ATP. Esses processos de modificação das respostas celulares propostos e consequente alteração das cadeias metabólicas, denominou-se biomodulação. Essa capacidade luminosa trás por sua vez efeitos bioenergéticos, bioelétricos, bioquímicos e bioestimulatórios positivos sobre as células. Todos esses processos em conjunto aumentam a síntese de produção de Adenosina Trifosfato necessária para reações intracelulares, facilitando e exacerbando os processos de reparo e aceleração da divisão celular (DA SILVA; CAMILLI, 2006).

A laserterapia de baixa intensidade em tecidos moles tem sido usada para acelerar o reparo de feridas e controlar a dor. Em tecido ósseo, por sua vez, a aplicação tem-se mostrado efetiva na modulação da inflamação, acelerando a proliferação celular e o processo de reparo. São raros os estudos que encontraram evidências do efeito sistêmico do laser sobre o tecido ósseo ou tecido mole, e o seu real impacto nos processos de reparo quando comparado a grupos irradiados e não irradiados (MERLI et al., 2005; GERBI et al., 2005; TORRES et al., 2008), não havendo portanto um consenso quanto a um protocolo efetivo de aplicação. É provável que a regeneração óssea seja dependente não apenas da dose de energia total da radiação laser, mas também, do tempo e da forma de aplicação (PINHEIRO et al., 2006). Considerando o universo atual dos estudos sobre os efeitos do LB no reparo dos tecidos, não parece haver uma abordagem de aplicação definida, o que nos sugere novos estudos e novas propostas terapêuticas.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito do laser em baixa intensidade na cicatrização de defeitos ósseos preenchidos com vidro bioativo.

Hipótese nula - O laser de baixa intensidade não influenciará a cicatrização de defeitos ósseos preenchidos com vidro bioativo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIALE MÉTODOS

4.1 Modelo Experimental

Foram utilizados 60 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar) (Figura 1), pesando entre 250g e 300g (Universidade de São Paulo – USP, do Biotério Central da Faculdade de Odontologia do Campus de Bauru – SP). Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de 12 horas de luz por dia e temperatura entre 22 e 24° C. Durante todo o experimento, os animais consumiram ração sólida selecionada e água *ad libitum*.

Figura 1 - *Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar.

4.2 Procedimento Cirúrgico

Para realização de todos os procedimentos experimentais, os ratos foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (Vetbrands, Paulínia, Brasil) (0,02 ml/kg) e cloridrato de quetamina (Vetbrands, Paulínia, Brasil) (0,4 ml/kg). Após tricotomia e anti-sepsia da parte dorsal do crânio de cada animal, foi realizada incisão semilunar na calvária e deslocado um retalho de espessura total. Um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5 mm de diâmetro foi criado com uma trefina (Neodent, Curitiba, Paraná, Brasil) em baixa rotação, sob irrigação abundante com solução

salina estéril. A dura-máter foi preservada durante a craniotomia, e parte do osso removido (osso parietal), mantendo-se a integridade do encéfalo.

Uma marcação foi feita 2 mm anterior e outra 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. Estas marcações foram úteis para a identificação do meio do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial e, também, para localizar as suas margens ósseas originais durante a análise histométrica (Cunha, 2012).

Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos (n=10) de acordo com o material:

- 1) **Grupo C** (controle) - preenchimento do defeito de tamanho crítico (DTC) com coágulo sanguíneo;
- 2) **Grupo OA** – preenchimento do DTC com osso autógeno;
- 3) **Grupo VB**– preenchimento do DTC com vidro bioativo Biogran® (Biomet 3i, Estados Unidos);
- 4) **Grupo L**– preenchimento do DTC com coágulo sanguíneo e aplicado laser em baixa intensidade (TheraLase DMC®, São Carlos, SP, Brasil);
- 5) **Grupo OA + LB**– preenchimento do DTC com osso autógeno e aplicação do laser em baixa intensidade;
- 6) **Grupo VB + LB**– preenchimento do DTC com vidro bioativo e aplicação do laser em baixa intensidade.

O retalho foi reposicionado e suturado com fio de seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil) e em seguida todos os animais receberam uma injeção intramuscular de 24.000 unidades de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

Figura 2 - A) Tricotomia e antisepsia da parte dorsal do crânio. B) Incisão semilunar da calvária.

Figura 3 - A) Retalho descolado e posicionado para visualização da calvária. B) Guia cirúrgico em posição para confecção do defeitos e posicionamento das canaletas.

Figura 4 - A) Trefina em posição seguindo o guia cirúrgico para realização do defeito. B) Defeito realizado equidistantes 2mm das margens do amálgama.

Figura 5 - A) DTC preenchido com osso autógeno B) DTC preenchido com vidro bioativo.

4.3 Protocolo de aplicação do laser de baixa intensidade

O laser utilizado foi o TheraLase DMC® (Figura 6A), modo de emissão contínua, com meio ativo GaAlAs, comprimento de onda de 808nm, potência de 100mW, densidade de energia de 210J/cm² por ponto durante 60s/ponto e foram realizados quatro pontos na superfície do defeito cirúrgico criado e um ponto central. Cada ponto recebeu uma dose de energia de 6J. As aplicações foram realizadas apenas uma vez, após a confecção do defeito cirúrgico, com auxílio de um guia cirúrgico pré-fabricado seguindo as dimensões do defeito. No grupo LB, a aplicação foi realizada antes e após o preenchimento com coágulo sanguíneo. Nos grupos preenchidos com coágulo sanguíneo, a aplicação central foi realizada sobre o coágulo, enquanto nos grupos que utilizaram material de enxerto (VB), a aplicação central foi realizada após preenchimento do defeito com o material VB. As aplicações foram realizadas seguindo um protocolo padronizado e os pontos de aplicação foram realizados na superfície do defeito, seguindo as posições do relógio” (12h, 3h, 6h, 9h) além do ponto central (ALMEIDA et al., 2014) (Figura 6B).

Figura 6 – A) Laser de baixa intensidade TheraLase DMC®. B) Pontos de aplicação do laser de baixa intensidade

4.4 Processamento Tecidual

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias pós-operatórios, com 5 mg/ml da associação de cloridrato de quetamina e xilazina. A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. As peças foram fixadas em solução de formol neutro a 10%, lavadas em água corrente e

descalcificadas em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético- EDTA a 18% (Dinâmica®, Química Contemporânea Ltda., Diadema, Brasil). Após descalcificação, cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usando-se as marcações de amálgama como referência. As peças foram, então, processadas e incluídas em parafina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Foram realizados cortes seriados longitudinais, com 6µm de espessura, iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original (CUNHA, 2012). Os cortes foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Massom (TM) para análises com microscopia de luz.

4.5 Análise Histomorfométrica

As imagens de quatro cortes histológicos representando a área central do defeito cirúrgico de cada grupo foram capturadas com a câmara digital SPOT RT3 – 2540 Color Slider 2.0Mp (SPOT Imaging Solutions, Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, EUA).

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

Foram selecionados para as análises histológicas e histométricas, quatro cortes histológicos, representando a área central do defeito cirúrgico original. Em cada imagem, foi realizada uma delimitação da área a ser analisada, que foi 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 mm² e representou 100% da área analisada. AON e APR também foram medidas em mm² e calculadas como porcentagens da AT (MELO et al., 2005; MESSORA et al., 2008, ALMEIDA et al., 2014, CUNHA et al., 2014; ESPER, 2015)(Figura 7).

Figura 7 – Fotomicrografia de corte histológico, 2x H.E. A área total (AT) é delimitada pela linha amarela e corresponde a área da calvária na qual o defeito cirúrgico foi criado. A altura da área total (X) corresponde a espessura do osso original da calota (Y). A área de osso neoformado (AON) está delimitada pelas linhas vermelhas. A área de partícula remanescente (APR) está delimitada pelos desenhos azuis.

4.6 Análise dos resultados

As áreas de osso neoformado (AON) e as áreas de partículas remanescentes de vidro bioativo (APR) foram calculados em relação a área total (AT), em porcentagem. A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram analisadas e utilizou-se o teste paramétrico ANOVA, seguido pelo teste Tukey, e o teste t. Para todos os testes, o nível de 5% de significância foi adotado.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Ao longo do processamento laboratorial para inclusão em lâminas histológicas, foram perdidos um espécime dos grupos C e OA, dois espécimes dos grupos OAL e VB e três espécimes dos grupos L e VBL.

5.1 Análise histológica

Em análise histológica do grupo C, observou-se a presença de fibras colágenas paralelas ao longo do defeito criado. Houve discreta neoformação óssea, sendo que nenhum espécime apresentou um completo fechamento do defeito ou restabelecimento da espessura original da calvária (Figura 8).

Figura8 – A) Fotomicrografia do grupo C. Visão panorâmica do defeito cirúrgico. 4x, HE. B) Região central do defeito: presença de fibras colágenas paralelas e sem a presença de osso neoformado. 40x, TM.

No grupo L, observou-se a presença de osso neoformado interpostos por matriz osteóide e osteócitos aprisionados. Pode-se observar uma maior tendência de fechamento do defeito por novo osso. Assim como no grupo C, não houve o restabelecimento da espessura original da calvária (Figura A)

Figura 9 – A) Fotomicrografia do grupo L. Visão panorâmica do defeito cirúrgico. 4x, HE. A espessura da calvária não é mantida. B) Neoformação óssea em direção ao centro do defeito cirúrgico. 40x, TM.

No grupo OA, verificou-se a presença de matriz óssea e um tecido conjuntivo bem organizado e fibroblastos na região. Observou-se a presença de novo osso nas margens do defeito (Figura 10 A) e envolvendo as partículas enxertadas. A manutenção da espessura da calvária não foi constante nesse grupo.

Figura 10 – A) Fotomicrografia do grupo OA. Visão panorâmica do defeito cirúrgico. 4x, HE. Nota-se a presença de tecido ósseo neoformado nas extremidades do defeito. B) Limite entre a partícula do enxerto autógeno (à direita do asterisco) e osso neoformado (à esquerda do asterisco).

No grupo OAL observou-se a presença de matriz óssea em uma maior quantidade de grupos estudados, com um tecido conjuntivo organizado e fibroblastos na região. Partículas ósseas remanescentes foram observadas, bem como a presença de tecido ósseo neoformado circundando as mesmas.

Figura 11 –Fotomicrografia do grupo OAL. Visão panorâmica do defeito cirúrgico. 4x, HE. Presença de tecido ósseo neoformado nas margens do defeito e fibras colágenas orientando-se paralelamente. Partículas ósseas remanescentes com áreas de novo osso nas periferias. A manutenção da espessura da calvária não se manteve constante nesse grupo.

No grupo VB observou-se partículas remanescentes e a presença de tecido conjuntivo organizado com alta quantidade de células e disposto paralelamente ao redor da cerâmica. As partículas de vidro bioativo e o tecido conjuntivo circunjacente formam uma faixa com espessura similar à do tecido ósseo original da calota craniana. Observa-se área de novo osso nas extremidades do defeito.

Figura 12 –A) Fotomicrografia do grupo VB. Visão panorâmica do defeito cirúrgico e partículas remanescentes. Nota-se a manutenção da espessura original da calvária. 4x, HE. B) Partículas remanescentes interpostas por tecido conjuntivo organizado e fibroblastos na região. 10x, TM. C) Maior aumento retratando a organização colágena envolvendo as partículas remanescentes de VB. 20x, TM.

No grupo VBL observou-se partículas remanescentes e a tendência de formação de novo osso para o centro do defeito criado cirurgicamente. As partículas de cerâmica e o tecido conjuntivo formam uma faixa com espessura muito similar à do tecido ósseo original da calota. Nota-se partículas de vidro bioativo circundadas por tecido conjuntivo fibroso rico em fibroblastos, matriz osteóide e osteoblastos e uma tendência de migração de tecido conjuntivo com células organizadas para interior das mesmas.

Figura 13 – A) Fotomicrografia do grupo VBL. Visão panorâmica do defeito cirúrgico e partículas remanescentes. Nota-se a manutenção da espessura original da calvária. 4x, HE. B) Partículas remanescentes interpostas por tecido conjuntivo organizado e fibroblastos na região (*). 20x, TM. C) Partícula em maior aumento denotando a organização colágena (*) e invasão de células e tecido conjuntivo organizado para o interior da partícula (seta).

5.2 Análise estatística

A análise estatística descritiva dos valores de área de osso neoformado (AON) está representada na tabela 1.

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

Grupo	N	Média	Desvio-Padrão	Q25	Mediana	Q75
C	9	9,96	4,49	6,64	9,52	14,32
L	7	47,67	8,66	43,96	44,58	55,41
OA	9	30,98	16,59	19,36	25,10	36,83
OAL	8	39,15	16,72	25,96	40,41	53,36
VB	8	25,90	37,71	22,03	25,85	30,03
VBL	7	31,13	16,98	19,80	29,30	50,10

A maior média de AON foi encontrada no grupo L (47,67 $\pm$ 8,66), seguido pelos grupos OAL (30,98 $\pm$ 16,59) e VBL (31,13 $\pm$ 16,98). Todos os grupos irradiados com laser tiveram resultados superiores aos que não foram irradiados (Tabela 1).

A análise comparativa das médias de AON do grupo C com os demais grupos está representada na tabela 2.

Tabela 2- Comparação múltipla dos valores de AON entre o grupo C e os demais estudados (Teste de Tukey $p < 0,05$).

Grupos	Média das diferenças	Intervalo de Confiança	P<0,05
C – L	-37,71	- 56,57 a -18,85	Sim
C – OA	-21,02	- 38,66 a -3,37	Sim
C – OAL	-29,19	- 47,38 a -11,00	Sim
C – VB	-15,93	-34,12 a -2,25	Não
C – VBL	- 21,17	- 40,03 a -2,30	Sim

Houve diferença estatisticamente significativa em relação ao AON entre o grupo C e os demais grupos com exceção da comparação com o grupo VB (Tabela 2).

As comparações múltiplas dos valores de AON entre os grupos estão representadas nas tabelas 3, 4, 5 e 6.

Tabela 3- Comparação múltipla dos valores de AON entre o grupo L e os demais estudados (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Grupos	Média das diferenças	Intervalo de Confiança	P<0,05
L – OA	-16,69	- 2,17 a -35,55	Não
L – OAL	-8,52	- 10,85 a -27,89	Não
L–VB	-21,78	- 2,40 a -41,15	Sim
L – VBL	-16,54	-3,46 a -36,55	Não

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos L e VB quanto aos valores de AON (Tabela 3).

Tabela 4- Comparação múltipla dos valores de AON entre o grupo OA e os demais estudados (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Grupos	Média das diferenças	Intervalo de Confiança	P<0,05
OA – OAL	-8,17	- 26,36 a -10,02	Não
OA – VB	-5,08	- 13,10 a -23,27	Não
OA–VBL	-0,14	- 19,01 a -18,71	Não

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo OA e os demais grupos quanto aos valores de AON (Tabela 4).

Tabela 5- Comparação múltipla dos valores de AON entre o grupo OAL e os demais estudados (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Grupos	Média das diferenças	Intervalo de Confiança	P<0,05
OAL – VB	-13,26	-5,45 a -31,97	Não
OAL – VBL	-8,02	-11,35 a -27,39	Não

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo OAL e os grupos VB e VBL quanto aos valores de AON (Tabela 5). Também não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo VB e VBL (Teste Tukey, $p > 0,05$).

A análise estatística descritiva dos valores de área de partículas remanescentes (APR) está representada na tabela 6.

Tabela 6- Média, desvio-padrão, Q25, mediana e Q75 dos valores de área de partículas remanescentes (APR) em %, dos grupos VB e VBL.

Grupo	N	Média	Desvio-Padrão	Q25	Mediana	Q75
VB	8	25,15	4,82	20,11	26,98	28,13
VBL	7	17,06	9,01	8,00	19,00	22,70

A maior média de APR foi encontrada no Grupo VB ($25,15 \pm 4,82$), seguido pelo grupo VBL ($17,06 \pm 9,01$) (Tabela 6).

Não ocorreu diferença estatisticamente significativa na comparação entre as partículas de VB e VBL na comparação entre os valores de APR (Teste t, $p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O laser de baixa intensidade não influenciou a cicatrização de defeitos ósseos (AON) preenchidos com vidro bioativo quando comparado ao vidro bioativo somente, porém, ambos os grupos apresentaram maior manutenção da espessura da calvária quando comparados aos demais estudados.

A escolha do modelo animal, tipo, localização e tamanho do defeito possui implicação direta nos resultados dos estudos. Neste estudo utilizou-se o defeito de tamanho crítico de 5 mm de diâmetro realizado na calvária de rato.

A literatura apresenta grande variedade de diâmetros de tamanho crítico nesse modelo animal. Alguns autores propuseram que o diâmetro do defeito em ratos poderia variar entre 2 e 9 mm, e que sua capacidade da neoformação aconteceria as custas desses tamanhos (FREEMAN; TURNBULL, 1973; MULLIKEN; GLOWACKI, 1981; TAKAGI; URIST, 1982; BUSCH et al., 1996, ALMEIDA et al., 2014).

Gosain et al. (2000) definiram defeito de tamanho crítico como sendo um defeito com tamanho que não cicatrizará completamente durante o período de duração do estudo. Baseado nesta informação Almeida et al. (2014) utilizaram defeitos de 5 mm de diâmetro e demonstraram que em 30 dias os defeitos não tratados, preenchidos somente com coágulo sanguíneo não cicatrizaram. Recentemente foi publicada uma revisão sistemática onde os autores consideraram que defeitos com 5 mm de diâmetro em calvária de ratos são de tamanho crítico (VAJGEL et al., 2014).

O uso da calvária de ratos como modelo de estudo permite a confecção de um defeito de forma rápida, com baixo custo e de fácil manuseio do animal no trans e pós operatório, embora o tamanho pequeno da calvária e a fragilidade da dura-máter exijam habilidade operatória (SPICER et al., 2012). Segundo Cooper et al. (2010), as injúrias ocasionadas nessa estrutura pode estar diretamente relacionada ao insucesso de resultados, visto que sugere a dura-máter como fonte primária de células potencialmente viáveis.

A regeneração óssea é tema atual, sobretudo quando envolve a necessidade da manutenção tridimensional da arquitetura tecidual em sítios prévios a instalação de implantes dentários e reabilitações protéticas. Estudos demonstram que o manuseio da ferida cirúrgica apenas com coágulo pode não atender as expectativas visto o limitado potencial regenerativo do coágulo isolado (SCHOROPP et al., 2006; ARAUJO et al., 2005). Estudos em calvárias de ratos que avaliaram cicatrização óssea em defeitos de tamanho críticos preenchidos somente com coágulo sanguíneo observaram as menores taxas de formação óssea tanto em espessura quanto em extensão (ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014, ESPER, 2015). Esses achados corroboram com os do presente estudo no qual o grupo controle apresentou os resultados menos expressivos nas médias de AON e a não manutenção da arquitetura original da calvária.

O restabelecimento da arquitetura óssea perdida pode ser feita através de materiais de enxertia. Nesse estudo, utilizou-se o osso autógeno em um dos grupos por ser considerado *gold standard*, devido as suas propriedades biológicas favoráveis. Os resultados obtidos nos grupos OA e OAL foram superiores aos encontrados no grupo controle, corroborando com os resultados encontrados por Almeida et al. (2014) e Cunha et al. (2014) em relação as áreas de AON. O osso autógeno possui algumas desvantagens como taxa de reabsorção não controlada (HALLMAN; THOR, 2008), disponibilidade limitada, necessidade de um segundo sítio cirúrgico (SCHMITT et al., 2013), infecções (BLOKHUIS; ARTS 2011), maior morbidade e maior tempo cirúrgico (SCHMITT et al., 2013) o que tem acarretado a busca por novos biomateriais.

Não há na literatura um biomaterial considerado ideal, que atenda todas propriedades biológicas recomendadas. O vidro bioativo é um material sintético, aloplástico, a base de cálcio, fosfato, e dióxido de silício (NAYER, 2009), agregados aos íons bioativos, que promovem uma similaridade com o osso humano, indicando seu uso em situações clínicas nas quais há necessidade de reconstrução dos defeitos ósseos ou teciduais eliminações anatômicas durante processos reabilitadores (BURG, 2000; MARDAS et al., 2008; MCALLISTER; HAGHIGHAT, 2007). Os resultados obtidos no grupo VB do presente estudo, não apresentaram áreas de neoformação óssea superiores aos encontrados no grupo controle, no entanto, pode-se observar que as partículas de vidro bioativo puderam manter a

espessura do osso original da calvária, enquanto o grupo OA, embora melhor que o grupo C em porcentagem de AON, não demonstrou o mesmo potencial osteocondutor do biomaterial, corroborando com o estudo de Sculean et al. (2002), no qual relata que o vidro bioativo impediu o colapso do retalho, colaborando para a estabilidade e manutenção da arquitetura tecidual próxima da normalidade. As propriedades positivas do VB como um bom preenchedor ósseo são atribuídas à sua capacidade osteocondutora e a formação da camada externa de cálcio e fosfato, que possibilitaria a manutenção do volume das partículas preenchidas (FURUSAWA et al., 1998).

Com a finalidade de otimizar o reparo ósseo de feridas cirúrgicas, a estimulação de sítios com laser em baixa intensidade aparece como uma importante alternativa adicional de tratamento (SILVA, 2006; PINHEIRO; GERBI, 2006). Em tecidos duros, Dörtbudak et al. (2002) observaram que as irradiações com laser em baixa intensidade aumentaram significativamente o número de osteócitos viáveis na região irradiada. Em defeitos ósseos, a aplicação do laser revelou alto potencial para a formação de novo osso, visto que após 4 semanas da irradiação, observou-se histologicamente um tecido conjuntivo altamente organizado com células potencialmente viáveis a neoformação (ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014, ESPER, 2015), corroborando com os achados do presente estudo, nos quais observou-se que nos grupos irradiados com laser havia presença de áreas com matriz óssea bem definida e osteócitos aprisionados nela, bem como extensas áreas de tecido conjuntivo organizados e dispostos paralelamente o que nos aponta a possibilidade de um potencial elevado para o reparo ósseo. Neste estudo, todos o grupos irradiados com laser, exceto o grupo VBL, demonstraram um potencial maior para neoformação óssea, no período avaliado. Esses achados não corroboram com o estudos de Almeida et al. (2014) e Cunha et al. (2014), no qual todos os grupos irradiados com laser apresentaram resultados superiores aos grupos não irradiados.

Alguns autores relatam a dificuldade e as limitações clínicas do uso do laser em ambiente clínico, devido a necessidade de retornos consecutivos e presença constante do paciente para irradiações. Não há na literatura um consenso que determine um protocolo ideal de aplicação único ou materiais para sua ativação, o que pode conflitar os resultados encontrados em diferentes pesquisas, pela

dificuldade de padronização dos métodos (DA SILVA et al., 2010; GARCIA et al., 2012).

Quando associado ao laser ao vidrobioativo (grupo VB), não foi observado a mesma diferença estatisticamente significativa que foi encontrada na comparação entre os grupos C e L, muito embora histologicamente pode-se observar a evidente manutenção da espessura original da calvária tanto em VB quanto em VBL e a presença das partículas em ambos os grupos, confirmando o lento processo de reabsorção desse material (NORTON; WILSON, 2002), o que talvez possa explicar a menor porcentagem de AON nos grupos preenchidos com biomaterial. Schepers e Ducheyne (1997) relataram a presença de cerâmica de vidro bioativo até 24 meses após sua colocação em defeitos criados cirurgicamente.

Embora não tenha sido encontrada diferença estatisticamente significativa de AON entre os grupos OA e OAL, histologicamente é possível observar a tendência de formação óssea do grupo irradiado para o centro do defeito, com áreas de osso neoformado nas periferias das partículas. Esses achados também foram observados na comparação realizada entre os grupos VB e VBL que embora não apresentasse diferenças significativas de AON, observou-se histologicamente no grupo irradiado uma quantidade maior de matriz osteóide rica em osteoblastos e tecido conjuntivo fibroso envolvendo as partículas de VB. Segundo Wheeler et al. (1997), essas fibras colágenas podem indicar desenvolvimento de matriz para futura infiltração celular, mineralização e formação óssea. Foram observadas fissuras e centros escavados nas partículas de vidro bioativo nos grupos VBL, com a invasão de células, provavelmente do tipo mesenquimais indiferenciadas, corroborando com resultados observados em outros estudos (FURUSAWA et al., 1998; TADJOEDIN et al., 2002).

O laser de baixa intensidade na cicatrização óssea tem demonstrado resultados promissores, quando utilizado como coadjuvante com alguns materiais de enxertia, para acelerar o processo de cicatrização e manutenção da espessura em calvárias de ratos. Ainda se fazem necessários mais estudos com maior tempo de observação em animais e posteriormente em humanos para determinação de protocolos efetivos.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Baseando-se na metodologia empregada e no que foi apresentado anteriormente, concluímos que o laser em baixa intensidade não influenciou a cicatrização de defeitos ósseos preenchidos com vidro bioativo, aceitando, dessa forma, a hipótese nula.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AbboElSaad N, et al. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study). *Lasers in medical science*.2009 May;24(3):387-95

Almeida ALPF, Medeiros IL, Cunha, MJS, Sbrana MC, de Oliveira PGF, 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 calvária. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Oct;25(10):1131-6.

Bashardoust Tajali S, et al. Effect of low-power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis. *J Orthop Surg Res*. 2010 Jan 4;5:1.

Bezerra JFB, Lenharo A. *Terapia Clínica Avançada em Implantodontia*. São Paulo: Artes Médicas, v.1. 2002. 36-38.

Blokhuis TJ, Arts JJ. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths. *Injury* 2011 Sep;42 Suppl 2:S26-9.

Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical size bone defect in testing bone regenerating materials. *The Journal of craniofacial surgery*. 1998 Jul; 9(4):310-6

Bowers GM, Reddi AH. Regeneration of the periodontium in advanced periodontal disease. *J Am Dent Assoc* 1992;122:45-8.

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

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

Busch O, et al. Guided tissue regeneration and local delivery of insulinlike growth factor I by bioerodible polyorthoester membranes in rat calvarial defects. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 1996 Aug;11(4):498-505.

Calhoun NR, Greene Junior GW, Blackedge GT. Plaster: a bone substitute in the mandible of dogs. *J. Dent. Res.* 1965 Sep-Oct;44(5):940-6.

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

Chan C, Thompson I, Robinson P, Wilson J, Hench L. Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002 Feb; 31(1):73-77.

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

Cunha MJ, Esper LA, Sbrana MC, de Oliveira PG, do Valle AL, de Almeida AL. Effect of low-level laser on bone defects treated with bovine or autogenous bone grafts: in vivo study in rat calvaria. *Biomed Res Int.* 2014;2014:104230. doi: 10.1155/2014/104230. Epub 2014 May 28

Cunha MJS. Avaliação da cicatrização de defeitos ósseos criados cirurgicamente em calvárias de ratos e tratados com enxertos de origem bovina (Bio-Oss®) associados ao laser de baixa intensidade. Estudo histológico e histométrico. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo, Bauru, 2012.

Deporter DA, et al. Reconstituted bovine skin collagen enhances healing of bone wounds in the rat calvaria. *Calcif. Tissue Int.* 1988 May;42(5):321-5.

Dominiak M, Lysiak-Drwal K, Solski L, Zywicka B, Rybak Z, Gedrange T. Evaluation of healing processes of intraosseous defects with and without guided bone regeneration and platelet rich plasma. An animal study. *Annals of anatomy Anatomischer Anzeiger: official organ of the anatomische gesellschaft.* 2012 Nov;194(6):549-55.

Dortbudak O, Haas R, Mailath-Pokorny G. Effect os low-power laser radiation bone implants sites. Clin Oral Implants Res. 2002 Jun;13(3):288-92.

Enneking WF, et al. Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. J. Bone Joint Surg. Am. 1975 Mar;57(2):237-52.

Esper, L.A. 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 (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo, Bauru, 2015.

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

Freeman E, TurnBull RS. The value of osseous coagulum as a graft material. J. Periodont. Res. Mar 1973;8(4):229-236.

Furlaneto FAMJ, et al. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glaa/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. Clin Oral Implants Res. 2007 Jun;18(3):311-8.

Glowacki J, Altobelli D, Mulliken JB. Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects. Calcif. Tissue Int. 1981 Jun 33(1):71-76.

Guiannoudis P, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. Int J Care Injured. 2005 Jul;36(3)s20-s27.

Hallman M, Thor A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complemente to autogenous bone for grafting in implant dentistry. Periodontology 2000. 2008 Jun;47:172-192.

Hench LL. & Paschall HÁ. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. Journal of Biomedical Materials Research. 1973 Jun;7:25-42.

Hench LL. Bioceramics. J. Am. Ceram. Soc. July 1998;81(7):1705-1728,

Hench LL. Ceramic implants for humans. Advanced Ceramic Materials. 1986 Jun;1(4):306-310.

Hkenke E, et al. Morbidity of harvesting of ch in grafts: a prospective study. Clin Oral Implants Res. 2001 July;12(5):495-502.

Hoexter DL, Bone Regeneration graft materials. J Oral Implantol. 2002 Jun;28(6):3-7.

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

Intini G, et al. A comparative analysis of boné formation induced by human demineralized freeze-dried bone and enamel matrix derivative in rat calvária critical-size bonedefects. Journal Periodontology. 2008 Jun;79(4):1217-1224.

Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, TerHeyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals. A systematic review. Int J Oral maxillofac Surg. 2012 July;41(0):114-120.

Johnson MW, Sullivan SM, Rohrer M, Collier M. Regeneration of peri - implant infrabony defects using PerioGlas: a pilot study in rabbits. Int J Oral MaxillofacImplants, 1997 Nov-Dec;12(6):835-9.

Lama EAD, Kihara Y. Biocerâmicas. Fundamentos de Mineralogia Aplicada, Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, p.6, 2003.

Macedo NL, et al. Bone defect regeneration with biactive glass implantation in rats. J Appl. Oral Sci. 2004 abr/jun;12(2):137-143.

Macneill SR, et al. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study. J.Clin. Periodontol. 1999 Apr;26(4):239-245.

Manalogas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Ver.* 2000 Jun;21(2):115-137.

Mardas N, Stravapoulos A, Karring T. Calvarial bone regeneration by a combination of natural an organic bovine-derived hydroxyapatite matrix coupled with a synthetic cell-binding peptide (PepGen TM): an experimental study in rats. *Clin Oral Implant Res.* 2008 Aug;19(10):1010-1015.

Marzouk KMAY, et al. Osteoconductive effects of vinyl styrene microbeads in rat calvarial defects. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Aug;65(8):1508-16.

Mcallister BS, Haghighat S. Bone augmentation techniques. *J Periodontol.* 2007 Aug;78(3):377-396.

Mendes SC, Reis RL, Bovell YP, Cunha AM, van Blitterswijk CA, Bruijin JD. Biocompatibility testing of novel starch-based materials with potential application in orthopaedic surgery. A preliminary study. *Biomaterials* 2001;22(14):2057-64

Nagata MJ, Messoria M, Pola N, Campos N, Vieira R, Esper LA, et al. Influence of the ratio os particulate autohenous bone graft/platelet-rich plama on Bone Healing in Critical-Size Defects: A histologic and Histometric study in rat calvária. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic research society.* 2010 Apr;28(4):468-73

Nagata, MJH, et al. Bone healing with bioactive glass and/or calcium sulfate. *J. Periodontol.* 2003 Oct;74(10):1559-1560.

Norton MR, WILSON J. Dental implants placed in extraction sites implanted with bioactive glass: human histology and clinical outcome. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2002 Mar/Apr;17(2):249-257.

Novaes Júnior AB, et al. Immediate implant in extraction socket with acellular dental matrix graft and bioactive glass: a case report. *Implant Dent.* 2002 Aug;11(4):343-348.

Obradovic, R, Kesie, L, Pesevska, S. Influence os low-level laser therapy on biomaterial osseointegration: a mini-review, *Lasers MedSci*. 2009 Apr;24(3):447-451.

Pilliar RM, et al. Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications – in vitro characterization. *Biomaterials*. 2009 May;22(9):963-972.

Pinheiro ALB, et al. Effect of low-level laser therapy on the repair of bone defects grafted wth inorganic bovine bone. *Braz Dent J*. 2003;14(3):177-181.

Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog*. 2009;25:1539-1560.

Pryor MEC, Susin et al. Validity of radiografic evaluations of bone formation in rat calvária osteotomy defect model. *J Clin Periodontol*. 2006 Jun;33(6):455-60.

Pryor MEJ. Yang, et al. Analysis of rat calvária defects implanted with a plated-rich plasma preparation: radigrapich observations. *J Periodontol*. 2005 Aug;76(8):1287-92.

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

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

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

Sculean, A et al. Clinical evaluation of as enamel matrix protein derivate combined with a bioactive glass for the treatment of intrabony periodontal defects in humans. *J. Periodontol*. 2002 Apr;73(4):401-408.

Silva RV, Camili JA. Experimental Study. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. *J Craniofac Surg.* 2006;17(2):297-301.

Sommernan M, Hewitt AT, Varner HH, Schiffmann E, Termine J, Reddi AH. Identification of bone matrix-derived chemotactic factor. *Calcif Tissue Int.* 1983;35:481-5.

Tadjoedin ES, et al. Histological observations on biopsies harvested following sinus floor elevation using a bioactive glass material of narrow size range. *Clin. Oral. Implants. Res.* 2000 Aug;11(4):334-344.

Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann. Surg.* 1982 July;196(1):100-109.

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

Veis A, et al. Bone regeneration around implants using spherical and granular form of bioactive glass particles. *Implant Dent.* 2006;15(4):386-394.

Verna C, et al. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. A micro-CT scan analysis. *J. Clin. Periodontol.* 2002 Sept;29(9):865-870.