



UNESP – Universidade Estadual Paulista
–Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Jônatas Caldeira Esteves

**Efeito de três sistemas de osteotomia - Ultrassom Cirúrgico, Laser
Er,Cr:YSGG e Sistema Rotatório - sobre o processo de
osseointegração e reparo de defeitos ósseos em tíbia de ratos -
Estudo histomorfométrico, imuno-histoquímico e biomecânico.**

Araraquara

2014



UNESP – Universidade Estadual Paulista
–Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Jônatas Caldeira Esteves

**Efeito de três sistemas de osteotomia - Ultrassom Cirúrgico, Laser
Er,Cr:YSGG e Sistema Rotatório - sobre o processo de
osseointegração e reparo de defeitos ósseos em tíbia de ratos -
Estudo histomorfométrico, imuno-histoquímico e biomecânico.**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Odontologia Área de Implantodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientador: *Prof Dr Elcio Marcantonio Junior*

Araraquara

2014

Esteves, Jônatas Caldeira

Efeito de três sistemas de osteotomia - ultrassom cirúrgico, LASER Er,Cr:YSGG e sistema rotatório - sobre o processo de osseointegração e reparo de defeitos ósseos em tíbia de ratos: estudo histomorfométrico, imuno-histoquímico e biomecânico./ Jônatas Caldeira Esteves.-- Araraquara: [s.n.], 2014.

130 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior

1. Osteotomia 2. Piezocirurgia 3. Terapia a LASER 4.
Osseointegração 5. Implantes dentários I. Título

JÔNATAS CALDEIRA ESTEVES

EFEITO DE TRÊS SISTEMAS DE OSTEOTOMIA – ULTRASSOM CIRÚRGICO, LASER Er,Cr:YSGG E SISTEMA ROTATÓRIO – SOBRE O PROCESSO DE OSSEOINTEGRAÇÃO E REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS EM TÍBIA DE RATOS – ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E BIOMECÂNICO.

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof Dr Elcio Marcantonio Junior (FOAr/UNESP)

2º Examinador: Prof Dr Roberto Henrique Barbeiro (FOAr/UNESP)

3º Examinador: Prof Dr Wilson Roberto Poi (FOAr/UNESP)

4º Examinador: Profa Dra Thallita Pereira Queiroz (UNIARA)

5º Examinador: Prof Dr Paulo Tambasco de Oliveira (FORP/USP)

Araraquara, 14 de Março de 2014.

DADOS CURRICULARES

Jônatas Caldeira Esteves

Nascimento: 07/06/1984 – Votuporanga-SP

Filiação: Jonas Dabes Caldeira Esteves
Edna Oliveira da Silva Esteves

2002-2005 Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

2006-2007 Aperfeiçoamento em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial
Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo-SP

2008-2010 Pós-graduação em Odontologia – Nível Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

2010-2014 Pós-graduação em Odontologia – Nível Doutorado
Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai *Jonas Dabes Caldeira Esteves*, minha mãe *Edna Oliveira da Silva Esteves* e irmã *Julianelli Caldeira Esteves* por serem as pessoas mais importantes de minha vida, meu porto seguro, e por me concederem apoio incondicional para vencer meus desafios. A educação, as lições de vida e o amor concedidos por vocês têm sido o alicerce sobre o qual tenho edificado tudo aquilo que tenho e sou. É por isso que tenho a mais profunda convicção de que essa conquista e qualquer outra que eu por ventura eu venha a galgar é tão minha quanto de vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, pela Sua infinita graça que diariamente se renova em minha vida, pela força e sabedoria que me concede para que eu trilhe cada um dos meus passos e pelo cuidado paterno que não me permite cair.

Ao meu orientador **Dr Elcio Marcantonio Junior** pela confiança e ensinamentos ao longo deste trabalho. Serei sempre grato pela generosidade e respeito com os quais me recebeu nesta faculdade e pelas oportunidades que tem me oferecido ao longo destes anos. Os aprendizados que obtive sob sua orientação vão além do conhecimento técnico e científico e muito contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional. Orgulho-me em tê-lo como orientador.

Ao meu orientador **Dr Giuseppe Intini** que generosamente me recebeu em seu laboratório na Universidade de Harvard e possibilitou a realização de um sonho. Obrigado por ter pacientemente me ensinado a enxergar a ciência com outros olhos e a romper os limites de minhas habilidades.

“[Ringrazio] Al mio tutor, Dtt. Giuseppe Intini, che, cortesemente, mi ha ricevuto nel suo laboratorio, all’Università di Harvard, e mi ha dato l’opportunità di realizzare un sogno. Grazie per avermi insegnato, con pazienza, a guardare la scienza con altri occhi e a vincere i limiti delle mie abilità”.

À minha amiga e grande mestre **Ana Paula de Souza Faloni**, dona de um talento especial para ensinar, motivar e inspirar seus alunos, um talento nato para a área acadêmica. Sua ajuda

foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho e seu apoio pessoal nos momentos difíceis me ajudou a superar os obstáculos. Você é uma pessoa rara.

À minha querida amiga **Katarzyna Wilk** que me fez sentir bem-vindo desde meu primeiro dia em Boston, tornando minha rotina de trabalho muito mais prazerosa. Obrigado pelos tantos ensinamentos no laboratório e pela enorme paciência com meu inglês. Você é muito especial para mim.

*“[I thank] my dear friend **Katarzyna Wilk** who made me feel welcome since my first day in Boston, making my work routine much more pleasurable. Thank you for had taught me so much in the lab and also for being so patient with my English. You are very special for me.”*

À minha ~~madrinha~~ **Fátima Peçanha** que não mediu esforços para abrir portas e me ajudar em todos os momentos que dela precisei durante minha temporada em Boston. Obrigado pelos tantos almoços durante o trabalho que davam um tempero tão brasileiro à comida americana. Sua amizade foi uma de minhas grandes conquistas nos Estados Unidos.

Aos meus amigos **Thallita Pereira Queiroz** e **Rogério Margonar**, exemplos de profissionais e de seres humanos os quais tenho tido o prazer de dividir anos de amizade e aprendizado. O incentivo que recebo de vocês é uma grande força motriz para minha carreira. Sou grato a Deus por ter colocado pessoas como vocês no meu caminho.

Aos meus queridos irmãos de fé **Márcia, Márcio, Sérgio, Dalva, Nilson Lopes, Célila, Daniel, Priscila, Rogério, Valéria, Willian, Silas, Tairine e Dagmar**. Agradeço a torcida e as orações que ajudaram a me manter de pé ao longo destes anos, vocês são parte dessa vitória.

À minha família, representada pelos meus avós **Pedro, Aparecida, Manuel** (*in memorian*), **Helena** (*in memorian*), **Cecília Eunice**; meus tios **Dagmar** (*in memorian*), **Débora** (*in memorian*), **José Dark, Elisabete, Rute, Eli, Edilamar, Wilson, Eliel, Sônia, Edmar, Marli**; meu cunhado **Alexandre** e meus queridos primos **Cleber, Elaine, Denise, Eliel Júnior, Carla, Débora, Laís, Leticia, Helena Cristina, Eli César, Paulo Henrique, Jeison e José Dark Junior**, que cada um, à sua maneira, têm me incentivado e torcido pelo meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

À *Faculdade de Odontologia de Araraquara– UNESP*, pela acolhida durante o curso de doutorado e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP*, pelo auxílio financeiro que foi fundamental para a realização deste trabalho. A FAPESP tem caminhado comigo desde minha primeira Iniciação Científica não apenas custeando minhas pesquisas, mas contribuindo para a realização de sonhos e metas pessoais.

Ao *Departamento de Diagnóstico e Cirurgia* da Faculdade de Odontologia de Araraquara–UNESP, representado por todos os seus professores e funcionários, pela oportunidade de cursar o Doutorado e pelo convívio com tantas pessoas maravilhosas que muito acrescentaram em minha vida.

À professora *Rosemary Adriana Chierici Marcantonio* pela constante ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos *Mário Verzola, Fausto Frizzera, Luiz Guilherme Freitas, Guilherme de Oliveira, Cássio Scarduelli e Rafael Molon* que por meio de muita amizade e cumplicidade tornaram estes anos em Araraquara mais fáceis e divertidos. Levo suas amizades como um grande troféu do meu doutorado.

À **Fernanda Rocha** e **Paula Macedo** pela amizade e ajuda tão generosa que me prestaram durante a elaboração da pesquisa, sem as quais não teria conseguido concluí-la.

Às cirurgiãs-dentistas **Patrícia Borges Nakata**, **Érika Robles Machado** e **Juliana Manoela de Aveiro** pela participação nas diferentes fases de elaboração da pesquisa.

Aos funcionários do departamento **Leandro**, **Cláudia**, **Maria José**, **Regina Lúcia**, **Ester** e **Maria do Rosário** pelo convívio tão agradável e disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação **Mara**, **Alexandre**, **Sérgio** e **Fábio** pela prestatividade com que me atenderam por tantas vezes que precisei.

Aos meus parceiros de trabalho e amigos **Augusto Gerin**, **Maria Fernanda Monteiro** e **Daniel Albuquerque** que acompanharam e estimularam minha luta na conquista deste título.

Ao meu amigo **Douglas Roberto Monteiro** pelos anos de amizade e constante apoio desde a graduação.

Aos meus sempre amigos **Fernando Guastaldi**, **Pedro Ivo Santos Silva** e **Heloísa Marão** pela amizade fraterna cultivada desde o mestrado que é tão importante para mim. Agradeço especialmente minha amiga **Heloísa** com quem compartilhei alegrias e sofrimentos da vida no exterior. Foram muitas viagens, reclamações, risadas e brigas que fizeram minha estada nos EUA ainda mais especial. Obrigado por ser uma pessoa tão especial.

Aos amigos **Adinael Trindade, Gustavo Tófolli, Jhonnathas Pereira e Guilherme Braido**, meus colegas de república que fizeram parte desta jornada como uma verdadeira família.

À **Universidade Camilo Castelo Branco**, na pessoa do coordenador do curso de Odontologia **Dr Nagib Pezati Boer**, que me deu a primeira oportunidade de exercer a docência. O apoio e coleguismo de cada docente e servidor desta faculdade tem me feito crescer como pessoa e profissional.

Aos meus colegas da Disciplina de Cirurgia da Unicastelo **Elisa Mattias Sartori, Mariângela Borghi de Lucia e Ovídio César Martin** pelo convívio saudável e pela oportunidade de aprender e ensinar juntamente com vocês.

Aos **meus queridos alunos** que a cada dia tem me estimulado e desafiado a exercer a docência. Os sucessos e insucessos como professor e o desafio de formá-los profissionais e cidadãos tem sido a fonte de energia e inspiração para me aprimorar naquilo que considero a mais louvável das facetas acadêmicas: a arte de ensinar.

A todos os meus amigos e colegas de pós-graduação **Andrés, Nicolau, Rubens Spin, Vagner, Rubens Moreno, Ana Lúcia, Cássia, Morgana, Sabrina Aquino, Gabriela Giro, Marina, Felipe Coleti, Livia Perussi, Rodrigo, Shellon, Halliny, Chaíne, Andressa, João Antônio, Lucas Fontanari, João Paulo Stefans, Sabrina Frasnelli, Leila, Telma, Cláudio, Túlio, Michele, Livia Finoti, Luana, Livia Moretti, Pablo, Marcel, Giovana, Felipe, Fabiana, Suzane, Vinícius Nepomuceno, Lígia, Rafael, Elton, Lélis, Fernanda Florian, Sâmara, Vinícios Ibiapina e Vinícios Paiva**.

Aos *meus professores*, desde a escola primária até a pós-graduação, que assentaram cada um dos pequenos tijolos da parede do conhecimento. Que me formaram tecnicamente, cientificamente e moralmente, que me motivaram por meio do conhecimento a fazer a diferença, não me conformando com paradigmas. Cada um dos meus mestres foi uma pessoa especial que me ensinou a usar a mais poderosa das ferramentas para mudar o mundo: a educação.

A *TODOS* que de forma direta e indireta ajudaram-me a chegar até aqui. Muito obrigado!

*As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.
A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas
vidas."*

(Clarice Lispector)

Esteves JC. Efeito de três sistemas de osteotomia – Ultrassom Cirúrgico, LASER Er,Cr:YSGG e Sistema Rotatório – sobre o processo de osseointegração e reparo de defeitos ósseos em tibia de ratos – Estudo histomorfométrico, imuno-histoquímico e biomecânico [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de reparo ósseo e a osseointegração de implantes inseridos em leitos cirúrgicos preparados por meio de Brocas Convencionais, Ultrassom Piezoelétrico e LASER Er,Cr:YSGG. Como objetivo secundário, foi testada a habilidade do ultrassom cirúrgico de estimular a liberação de citocinas e fatores de crescimento ósseo durante o processo de reparo. Para tanto, dois estudos distintos foram conduzidos. No Estudo 1, 144 ratos foram divididos em 3 grupos (Grupos Broca, LASER e Piezo) com 48 animais cada. Mini implantes usinados foram instalados em ambas as tíbias de cada animal em alvéolos cirúrgicos preparados pelos 3 sistemas testados de acordo com o grupo ao qual o animal pertencia. Após a intervenção cirúrgica, 8 animais por grupo foram sacrificados aos 0, 3, 7, 14, 30 e 60 dias pós-operatórios.. O implante da tibia direita foi utilizado para o ensaio de torque de remoção e o da tibia esquerda, para análise de Contato-Osso-Implante (COI) e Fração de Área Ocupada por Osso (FAOO). No Estudo 2, 174 animais foram divididos nos mesmos grupos experimentais – Broca, Piezo e Laser – com 63, 63 e 48 animais cada, respectivamente. Defeitos ósseos de 2mm de diâmetro foram produzidos na tibia direita dos animais usando um dos três dispositivos testados de acordo com o grupo ao qual o animal foi designado. Oito animais de cada grupo foram sacrificados aos 0, 3, 7, 14 30 e 60 dias e a cicatrização óssea foi analisada por histomorfometria e detecção imuno-histoquímica de Osteocalcina, Osteoprotegerina, Rankl, Vegf e Caspase-3. Cinco animais dos Grupos Broca e Piezo foram sacrificados aos 3, 7 e 14 dias e o espécimes coletados foram

utilizados para análise de PCR quantitativo (Q-PCR). Os resultados do Estudo 1 demonstraram a osseointegração dos implantes nos três grupos estudados. No Grupo Broca a formação óssea ocorreu mais precocemente, porém um aumento significativo no torque de remoção ocorreu somente aos 30 dias. Nos Grupos Laser e Piezo o torque de remoção aumentou precocemente e o reparo ósseo ao redor do implante foi progressivamente aumentado até os períodos tardios. Os resultados do Estudo 2 demonstraram diferenças no padrão de corte dos dispositivos testados, onde Proca e Piezo produziram osteotomias regulares enquanto o LASER produziu osteotomias irregulares com carbonização das margens do defeito. A neoformação óssea foi maior nos Grupos Piezo e Laser ao longo dos períodos de reparo, porém essa diferença foi detectada estatisticamente somente aos 30 dias entre grupos Piezo e Broca ($p < 0.05$). A expressão de caspase-3 foi significativamente menor aos 7 dias no Grupo Laser em comparação ao grupo Broca. Os resultados do Q-PCR evidenciaram expressões elevadas de Runx2 e Caspase-3 nos grupos Broca e Piezo aos 7 dias, respectivamente ($p < 0,05$). A análise dos resultados permite concluir que as osteotomias produzidas pelos três dispositivos testados são comparáveis, em termos de processo cicatricial e a formação óssea ao redor de implantes; e que o reparo ósseo produzido por ultrassom cirúrgico não possui o reparo ósseo acelerado pela liberação de fatores de crescimento.

Palavras-chave: Osteotomia, Piezocirurgia, Terapia a LASER, Osseointegração, Implantes Dentários.

Esteves JC. Effect of three osteotomy systems – Piezosurgery, Er,Cr:YSGG laser and Rotary System – on osseointegration and repair of bone defects in tibia of rats. Histomorphometrical, immunohistochemical and biomechanical study. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the bone healing process and osseointegration of implants placed in sockets prepared by conventional Drills, Piezosurgery and Er,Cr:YSGG laser. As a secondary objective we tested the ability of Piezosurgery of enhancing the bone repair by releasing of cytokines and growth factor. Therefore, two different studies were conducted. In study 1, 144 rats were assigned to 3 groups: Groups Drill, Laser and Piezo, with 48 animals in each group. Machined mini-implants were placed in both tibiae of each animal in sockets prepared by the three tested systems, according to the group in which it was assigned. After the surgical procedures, 8 animals were sacrificed postoperatively at 0, 3, 7, 14, 30 and 60 days in each group. The implant of the right tibia was used for removal torque test and the left tibia implant was used for Bone-to-Implant Contact (BIC) and Bone Area Fraction Occupancy (BAFO) analysis. In Study 2, 174 animals were assigned to the same experimental Groups - Drill, Piezo and Laser – with 63, 63 and 48 animals in each group. Bone defects with 2mm in diameter were created in the right tibia of each animal using one of the three tested devices according to the group in which it was assigned. Eight animals of each group was sacrificed at 0, 3, 7, 14, 30 and 60 days and bone healing were analyzed by means of histomorphometry and immunohistochemical detection of Osteocalcin, Osteoprotegerin, Rankl, Vegf and Caspase-3. Also, 5 animals from Groups Drill and Piezo were sacrificed at 3, 7 and 14 days and the bone samples were used for quantitative PCR (Q-PCR) analysis. Results of Study 1 demonstrated implant osseointegration in all experimental

groups. The Group Drill presented early bone formation, however, significant increasing in torque removal values occurred only at 30 days. In Groups Laser and Piezo, removal torque increased early and bone healing around the implant was progressively increased until later time-points. Results gotten from Study 2 showed differences on the cut characteristics among the tested devices, where Drill and Piezo produced regular osteotomies whilst Laser produced irregular osteotomies with carbonization at the defect margins. Bone neoformation was higher in Groups Piezo and Laser along the time-points, however, this difference was statistically significant only at 30 days between Groups Piezo and Drill ($p<0.05$). Expression of Caspase-3 was significantly lower at 7 days in Group Laser in comparison to Group Drill. Results of Q-PCR analysis demonstrated higher expression of Runx2 and Caspase-3 in Groups Drill and Piezo at 7 days respectively ($p<0.05$). According to the results it can be concluded that osteotomies produced by the three tested devices are comparable in terms of healing and bone formation around the implants; and piezosurgery has not the ability of accelerate the bone healing by an increased releasing of growth factors.

Keywords: Osteotomy, Piezosurgery, Laser Therapy, Osseointegration, Dental Implants.

Sumário

1 Introdução	02
2 Proposição	09
3 Estudos	11
3.1 Estudo 1	12
3.1.1 Artigo 1.....	12
3.2 Estudo 2.....	34
3.2.1 Artigo 1.....	34
3.2.2 Artigo 2.....	49
4 Conclusão	78
5 Referências	80
6 Apêndices	86
6.1 Apêndice 1 – Material e Método.....	87
6.2 Apêndice 2 – Resultados Adicionais.....	105
7 Anexos	113
7.1 Anexo 1 – Comitê de Ética.....	114

1 Introdução

O

procedimento de inserção de implantes dentários envolve a criação cirúrgica de leitos ósseos capazes de oferecer sustentabilidade e travamento adequados ao parafuso de titânio. Ao mesmo tempo, sob o ponto de vista biológico é necessária a presença de tecido ósseo viável em contato com a superfície do implante para que ocorra o processo de osseointegração¹.

Em uma técnica cirúrgica ideal, o osso deve receber o menor trauma possível, pois quanto menor a zona de desvitalização que se forma ao redor do implante em decorrência do trauma cirúrgico, maiores as chances de ocorrer a osseointegração¹⁰. Além disso, o leito deve permanecer livre de contaminações, uma vez que a presença de bactérias pode prejudicar a formação óssea ao redor do implante²⁵.

O uso de fresas ou brocas metálicas em contra-ângulos redutores, movidos a motores rotatórios elétricos, tem sido o padrão de instrumentos para a perfuração óssea em implantodontia. Estes sistemas permitem uma perfuração uniforme com paredes regulares, velocidade controlada e com fácil orientação tridimensional da posição da perfuração^{6,7}. Por outro lado, o calor friccional gerado durante a preparação cirúrgica de tecidos mineralizados pode produzir uma zona de desvitalização óssea ao redor da osteotomia, cuja extensão está condicionada a fatores como a velocidade de rotação, presença, ausência e intensidade de irrigação, material de composição da broca, capacidade de corte, densidade do osso a ser fresado e pressão exercida sobre ele^{11,29}. Segundo Eriksson, Albrektsson¹², temperaturas que excedem o limiar de 47°C durante 1 minuto produzem necrose do tecido ósseo. Dessa forma, o repetido uso das fresas durante o preparo para a instalação dos implantes diminui seu poder de corte e ocasiona trauma excessivo com aumento do calor friccional e conseqüente necrose do osso adjacente ao preparo, o que inviabiliza a osseointegração²⁹.

Sob o ponto de vista do manuseio destes equipamentos, as lesões produzidas a estruturas nobres como artérias, nervos e veias da face são acidentes relativamente comuns

com o uso de brocas, exigindo um bom adestramento manual e conhecimento anatômico do cirurgião². Além disso, durante a fresagem de alvéolos de implantes, a trepidação produzida pela ação da broca sobre o osso pode gerar uma sensação desconfortável a muitos pacientes¹⁶.

Com o objetivo de suplantiar estas desvantagens relacionadas ao uso das fresas, e ao mesmo tempo garantir a qualidade de corte ósseo com um processo de reparo otimizado, novas tecnologias têm sido desenvolvidas.

Desenvolvido no final da década de 1980, o Ultrassom Cirúrgico, ou Piezoelétrico age por meio da vibração controlada de certas cerâmicas ou quartzo, que estimulados pela corrente elétrica atingem uma frequência de 25 a 29kHz (Quilo Hertz), oscilação (amplitude) de 60 a 210µm (micrometros) com potência de até 50W (Watts). Estas oscilações geram cortes precisos e seletivos num campo cirúrgico claro, com mínima ou nenhuma injúria aos tecidos moles adjacentes como membranas vasos, artérias e nervos, uma vez que a frequência das micro-vibrações está ajustada para corte tecido ósseo^{34,35}.

Atualmente, a literatura apresenta trabalhos empregando a piezocirurgia em uma variada gama de procedimentos cirúrgicos como cirurgias de lateralização de nervo alveolar inferior²⁴, levantamento de seio maxilar⁴, coleta de enxerto ósseo autógeno¹⁸ e expansão óssea da crista alveolar⁹; de forma que a cirurgia piezoelétrica têm demonstrado excelentes resultados sob o ponto de vista de precisão e diminuição de lesões às estruturas adjacentes. Microscopicamente, em modelo animal, Vercetoloti et al.³⁴ verificaram um traço de osteotomia preciso, sem sinais de necrose ou pigmentação do tecido ósseo nas osteotomias realizadas com ultrassom.

Um dos primeiros trabalhos avaliando a osseointegração de implantes em alvéolos cirúrgicos preparados por ultrassom cirúrgico foi conduzido por Preti et al.²⁸, onde os autores, avaliaram aos 7, 14 e 56 dias a intensidade do processo inflamatório, a neoformação óssea, expressão de BMP-4, TGF-β2 e citocinas pró-inflamatórias no tecido adjacente às espiras do

implante inserido em tibia de *minipigs*. Os resultados demonstraram um menor infiltrado inflamatório nos leitos preparados com o ultrassom, maior quantidade de osteoblastos especialmente nos períodos iniciais do reparo e formação óssea precoce em comparação ao grupo das fresas. Outro importante achado nos resultados deste estudo foi uma maior expressão de BMP-4 e TGF- β 2 e menor expressão de citocinas pró-inflamatórias. Segundo os autores, o ultrassom cirúrgico, à semelhança dos ultrassons terapêuticos de baixa potência, teria a habilidade de induzir a expressão de fatores de crescimento favorecendo o reparo de osteotomias por ele produzidas.

Bengazi et al⁵ e Kfoury et al²⁰ têm testado a efetividade do Ultrassom Piezoelétrico na produção de osteotomias e cavidades cirúrgicas para inserção de implantes em modelos humanos e animais. De forma geral, a osseointegração dos implantes foi verificada em todos os estudos. Parâmetros como contato-osso-implante foram comparáveis entre implantes inseridos em cavidades produzidas por Ultrassom Piezoelétrico e Fresas Convencionais^{5,20}. Da Silva-Neto et al.⁸, em um recente estudo em humanos, encontrou maiores valores na Análise de Frequência de Ressonância em todos os períodos avaliados (0, 90 e 150 dias) em implantes inseridos em leitos preparados por Ultrassom Piezoelétrico em comparação aos leitos preparados por Brocas.

Uma opção recente e potencialmente inovadora para a diérese de tecidos duros são os aparelhos de LASER de alta potência ou alta intensidade. LASER é um acrônimo para a expressão inglesa *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que consiste em raios luminosos paralelos, com mínima divergência, coerentes ou sincronizados e com único comprimento de onda, que permite sua concentração em determinado ponto^{13,36}.

Em 2001, o LASER Er,Cr:YSGG (Érbio impregnado por Cromo: Ítrio-Scandio-Gálio-Garnet - Waterlase®) foi liberado pela FDA para uso em tecido mineralizado¹⁴. Este LASER possui propriedades semelhantes ao seu precursor Er:YAG, da mesma família dos LASER

Érbio. Ambos os lasers apresentam comprimentos de onda semelhantes: 2,96µm para o Laser Er:YAG e 2,78µm para o laser Er,Cr:YSGG e são absorvidos por íons hidroxila presentes no tecido. Contudo, o comprimento de onda do laser Er,Cr:YSGG possui absorção ainda maior pelos componentes hidratados do tecido água e pelos cristais de hidroxiapatita, tornando-o mais específico e diminuindo seus efeitos térmicos sobre o tecido.

O LASER Er,Cr:YSGG tem como parâmetros uma frequência de 20 Hz, 2,78µm de comprimento de onda com emissão pulsada, com duração de 140 a 150µm e potência ajustável entre 0 e 6W. A luz laser é produzida no corpo do aparelho e transmitida por uma fibra ótica que termina numa peça de mão com um cristal de safira, de onde parte o feixe de luz infravermelha em direção ao tecido alvo. O resfriamento dos tecidos durante a ação do laser é feito por meio de um sistema de spray de ar/água que pode ser ajustado entre 0 e 100% individualmente para ar ou água^{13,36}.

O LASER Er,Cr:YSGG tem sido empregado em odontologia respaldado por vários trabalhos clínicos estudos experimentais, em modelo animal, sendo utilizado na remoção da smear layer¹⁵, tratamento endodôntico¹⁹, terapia periodontal^{18,26}, cirurgias de tecido mole^{27,32}, remoção cirúrgica de tecido ósseo²³ e descontaminação da superfície de implantes³. Mais especificamente no tecido ósseo, o laser Er,Cr:YSGG oferece a vantagem de produzir cortes corretos, remoção cirúrgica precisa, ação hemostática e bactericida, com mínimo dano aos tecidos adjacentes^{36,21}. Microscopicamente, Wang et al.³⁶ encontraram, imediatamente após uma perfuração óssea a LASER realizada em maxila e mandíbula de coelhos, uma faixa de 70 a 90µm de osso desvitalizado ao redor de um ponto de perfuração, que aos 14 dias era substituído por tecido ósseo neoformado, e aos 56 dias já não podia mais ser observada.

Numa análise por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia dispersiva de raios X, Kimura et al.²¹ concluíram que as cavidades produzidas em tecido ósseo pelo laser

Er,Cr:YSGG eram regulares, com margens afiadas e paredes lisas, não produzindo variações de temperatura capazes de comprometer a vitalidade do osso adjacente.

Em relação ao preparo de leitos cirúrgicos para inserção de implantes, vários autores têm demonstrado a osseointegração de implante em modelos animais com alvéolos cirúrgicos preparados por meio de laser Er:YAG e Er,Cr:YSGG^{22,30,31,33}. Schwarts et al.³¹ demonstraram a osseointegração de implantes em leitos produzidos por laser Er:YAG e fresas na boca de cães, Os implantes instalados do grupo fresas obtiveram maior porcentagem de contato-osso-implante em ambos os períodos estudados (2 e 12 semanas). Stübinger et al.³³ obtiveram valores de contato-osso-implante semelhantes em implantes inseridos em pélvis de ovelha em 4, 6 e 8 semanas pós-operatórias em leitos preparados por ultrassom cirúrgico, Laser Er:YAG e brocas convencionais. Apesar da similaridade na formação óssea ao redor dos implantes, os valores de torque de remoção foram significativamente elevados no grupo laser em 8 semanas, comparado ao grupo broca.

Perussi et al.²⁷ realizaram osteotomias na calota craniana de ratos com fresa e laser Er,Cr:YSGG, observando um reparo ósseo semelhante entre os dois grupos com vantagem em termos de volume de osso neoformado nas osteotomias a laser aos 30 dias em comparação às osteotomias por broca.

Tanto o dispositivo piezoelétrico quanto o laser de alta potência Er,Cr:YSGG podem oferecer vantagens frente ao uso das brocas convencionais no preparo de leitos cirúrgicos para a instalação de implantes. Em face dos resultados demonstrados nas osteotomias realizadas com ultra-som, e aos recentes avanços dos lasers de alta potência nas cirurgias ósseas, um estudo detalhado dos mecanismos biológicos de reparo ósseo, bem como de todo o processo de osseointegração produzido ao redor de implantes instalados em cavidades preparadas por meio destes aparelhos, permitiria não somente respaldar seu emprego clínico em cirurgias

médicas e odontológicas, como também fornecer subsídios para futuros aprimoramentos na técnica de uso destes sistemas ou mesmo nas características dos próprios aparelhos.

2 Proposição

Este trabalho se propõe a analisar o processo de osseointegração de implantes inseridos em leitos cirúrgicos preparados por meio de fresas convencionais, Ultrassom Cirúrgico e Laser Er,Cr:YSGG. Adicionalmente, será estudado o processo de reparo defeitos ósseos não-críticos preparadas pelos mesmos dispositivos. Para tanto, dois Estudos independentes foram produzidos.

ESTUDO 1

Objetivo

Avaliar a dinâmica do processo de formação óssea ao redor de implantes inseridos em leitos cirúrgicos preparados por Brocas, Ultrassom Cirúrgico ou laser Er,Cr:YSGG, por meio de análise Biomecânica e Histométrica .

ESTUDO 2

Objetivo 1

Avaliar qualitativa e quantitativamente o processo de reparo de defeitos ósseos produzidos por Brocas, Ultrassom Cirúrgico e laser Er,Cr:YSGG, por meio de análise Histológica, Histométrica e Imuno-histoquímica.

Objetivo 2

Avaliar possíveis diferenças na expressão de fatores de crescimento e/ou proteínas osteogênicas durante o reparo de osteotomias produzidas por Ultrassom Cirúrgico.

O material e método e os resultados conjuntos de todas as análises estão descritas nos Apêndices 1 e 2

3 Estudios

Estudo 1

Artigo 1

Effects of laser and ultrasound osteotomy on implant osseointegration – a histometric and biomechanical study in rats*

Autores:

Jônatas Caldeira Esteves*

Paula Dellelo Macedeo*

Elcio Marcantonio Junior*

*UNESP- Univ. Estadual Paulista, School of Dentistry, Department of Diagnosis and Surgery, Division of Periodontology, Rua Humaitá, 1680, 14801-903 Araraquara – SP/Brazil

Correspondence

Jônatas Caldeira Esteves

jonaatsce@hotmail.com

Add. Rua Humaitá n. 1680

Department of Diagnosis and Surgery - UNESP

*Artigo Normalizado de acordo com as diretrizes da revista *Clinical Oral Implants Research**

Abstract

Objective: The aim of this study was to evaluate the influence of implant bed preparation by conventional drills, piezosurgery, and the Er,Cr:YSGG laser on osseointegration.

Material and methods: One hundred forty-four rats were divided into three groups (Drill, Piezosurgery, and Laser) with 48 animals each. The animals were anaesthetised, and both tibiae were surgically exposed to create a 2-mm-diameter defect at the metaphysis of both tibiae. A machined implant was then placed in each socket created. Eight animals in each group were sacrificed at zero, 3, 7, 14, 30, and 60 days postoperatively. The implant of the right tibia was used for the torque removal test, and the left tibia implant was used for laboratory processing for undecalcified histology for Bone-to-Implant Contact (BIC) and Bone Area Fraction Occupancy (BAFO) analyses.

Results: Osseointegration was observed in all groups. BIC and BAFO percentages showed a marked increase in the Drill group up to 7 days ($p < 0.05$); however, significant differences in torque removal were detectable only at 30 days ($p < 0.001$). In contrast, the Piezosurgery and Laser groups showed earlier increases in torque removal and progressive increases in BIC and BAFO up to later time-points. At 60 days, the Piezosurgery group reached the highest values of BIC ($p < 0.05$).

Conclusions: The Er,Cr:YSGG laser and piezosurgery are comparable to the conventional drill for implant bed preparation.

Key words:

1. Er,Cr:YSGG laser, 2. Piezosurgery, 3. Osseointegration, 4. Osteotomy, 5. Dental implants,
6. Laser, 7. Implantology

Surgical technique in treatment with dental implants is fundamental to ensure osseointegration. Characteristics of the surgical procedure – such as drilling speed, topical irrigation, bed implant design, and vitality around the surgical osteotomy – are key in the achievement of osseointegration. Thus, appropriate implant site preparation and the presence of healthy bone around the surgical alveolus are mandatory for osseointegration (Davies 2003).

Rotating burs have been used as the main instrument for implant alveolus preparation. This has been demonstrated to be a cost-effective system with easy maneuverability and speed control, producing regular and uniform osteotomies (Saha et al. 1982). Conversely, because it is the most traditional instrumentation system, the disadvantages and limitations of conventional rotary instruments are well-known. Queiroz et al. (2008) have demonstrated a progressive loss of cutting ability as long as the drills are used. As a consequence, the frictional contact between the drill and bone increases overheating, which may produce necrosis around the osteotomy, depending on bone density, rotary speed, and cooling technique (Cordioli & Majzoub 1997, Ercoli et al. 2004).

In recent years, innovative osteotomy devices have been developed and used in clinical practice, bringing improvements to bone surgeries. Piezosurgery is a micromovement-based bone-cutting device, surgical ultrasound, which has the potential to cut and remove bone with precision (Nordera et al. 2007, Yim & Demke 2012). With a 25-30KHz vibration, the insert, coupled with a handpiece, produces microfracturing and disperses bone fragments, making precise osteotomies with smooth walls and decreased bleeding (Sortino et al. 2008; Claire et al. 2013). Moreover, the vibration frequency adjusted for bone does not injure soft tissue, preventing damage to nerves and blood vessels (Shelley et al. 1986; Pappalardo & Guarnieri 2013). Since its approval for commercial use in 2002, piezosurgery has been widely used and described in the literature for orthopedic and maxillofacial surgeries. A previous

study by our group demonstrated that piezoelectric osteotomy is comparable, *in vivo*, to conventional drilling in terms of bone healing. Analysis of the healing of tibial defects showed similarity between drills and piezosurgery in terms of histomorphological characteristics of repair, new bone percentage, and the presence of genetic and proteic expression of bone markers, inflammatory cytokines, and apoptosis (Esteves et al. 2013).

Few works have studied the use of piezosurgery specifically for implant bone bed preparation and compared it to traditional methods. Rashad et al. (2013) evaluated micromorphological changes and residual metal from material attrition during implant site preparation by piezosurgery and conventional drills. They concluded that ultrasonic implant site preparation is associated with the preservation of bone microarchitecture and with the increased attrition of metal particles. Preti et al. (2007) studied the peri-implant osseous healing of titanium implants placed in surgical alveoli prepared with piezosurgery vs conventional drilling in the tibiae of minipigs. Peri-implant healing in the piezosurgery group presented earlier increases in BMP2 and 4, fewer inflammatory cells, and fewer proinflammatory cytokines. Bengazi et al. (2012) evaluated, among other variables, *in vivo* Bone-to-Implant Contact (BIC) percentages of implants inserted into dogs conventionally or with piezosurgery osteotomies. The BIC% values were higher at the drill (72%) compared to piezosurgery (67%) sites; however, the difference did not reach statistical significance. Recently, a clinical study conducted by da Silva Neto et al. (2014) used Resonance Frequency Analysis (RFA) to evaluate the stability of dental implants placed in surgical alveoli prepared by drilling and piezosurgery. The Implant Stability Quotient (ISQ), provided by RFA, showed that the piezosurgery group had significantly higher values than the drill group at all time-points evaluated (immediate, 90, and 150 days).

High-power lasers for tissue dissection arose in the 1960s with the carbon dioxide laser (CO₂ laser) (Deppe & Horch, 2007); however, thermal damage to surrounding tissue

limited its use in hard tissues such as bone and enamel. Technological improvements allowed for the development of new high-power lasers with more appropriate parameters for the cutting of hard tissues. The erbium, chromium: yttrium, scandium, gallium, garnet (Er,Cr:YSGG) laser emits a pulsating light with 2.78- μm wavelength which interacts by water and hydroxyapatite (Eversole & Rizoïu, 1995). This energy is absorbed by soft or hard tissues (depending on adjustable parameters) and produces ablation with minimal thermal damage (Kimura et al. 2001, Harashima et al. 2005, Perussi et al. 2012). Perussi et al. (2012) evaluated histological changes in rat calvarial defects produced by the Er,Cr:YSGG laser. Histomorphometric evaluation showed more tissue damage in the laser group, where carbonised bone was observed at defect. Nevertheless, the percentage of bone formation was higher at 30 days in the laser group ($p < 0.01$).

Stübinger et al. (2010) performed biomechanical and histological analyses to evaluate the influence of implant bed preparation with drills, piezosurgery, and the Er:YAG laser on commercial implants placed in the pelvises of sheep. All variables analysed were comparable among the different osteotomy techniques; however, the laser group presented higher torque removal values at 8 weeks ($p = 0.006$). The only study involving the Er,Cr:YSGG laser in implant bed preparation, evaluated in vitro, was conducted by Lee et al. (2010). The authors evaluated the ISQ and implant insertion variables (energy value absorbed by bone during implant surgery and load placed on the implant during implant insertion) of implants placed in Type I and Type II bones in pig ribs. According to the study, the ISQ in the laser group was higher in Type II bone ($p < 0.05$) and lower in Type I bone ($p < 0.01$), and insertion variables were similar between the groups.

Although the improvements brought by piezosurgery and high-power lasers to maxillofacial and orthopedic surgery are widely accepted, few studies have shown the influence of lasers and piezosurgery on bone healing around implants. Moreover, no other

study has compared these three osteotomy techniques when applied to implant bed preparation. Thus, the goal of this study was to evaluate the influence of implant bed preparation by conventional drills, piezosurgery, and the Er,Cr:YSGG laser on implant osseointegration by means of histometric and biomechanical analyses.

Materials and methods

Ethical board approval for this study was obtained from the Ethics in Animal Research Committee of the School of Dentistry of Araraquara (UNESP, Brazil, CEEA/FOAr 15/2010 – Anexo A). One hundred forty-four 3-month-old rats (*Rattus norvegicus albinus*, Holtzman) were used in this study. The rats were kept at a temperature of 22°C, in a 12-hour light/dark cycle, with water and food *ad libitum*. After a 15-day acclimatisation period, the animals were randomly assigned to one of the experimental groups: Group I (drill), Group II (piezosurgery), and Group III (laser).

Surgical procedure

All animals were subjected to the same surgical procedure under general anesthesia with a combination of xylazine (0.04 mL/100 g body weight) (Francotar, Virbac do Brazil Ind. Com. Ltda., São Paulo, Brazil) and ketamine (0.08 mL/g body weight) (Vyrbaxil, Virbac do Brazil Ind. Com. Ltda., São Paulo, Brazil). Preoperative trichotomy of the inner region of the legs was performed, and povidone iodine solution was applied to the surgical site to prevent possible sepsis. The same surgical procedure was performed in both tibiae. The implant placed in the right tibia was used for torque removal analysis, and the left tibia implant was used for undecalcified histology.

An incision of approximately 20 mm in length was made at the medial side of each tibia by the proximal metaphysis. Bone tissue was carefully exposed, and a monocortical

osteotomy of 2 mm in diameter was performed. For Group I, the defect was created with a starting drill of 1.8 mm in diameter, followed by a 2.0 mm twist drill. For Group II, a piezosurgery device [Piezo Master Surgery (EMS[®], Nyon, Switzerland)] was set for cortical bone osteotomy (“surgical” mode, maximal cutting efficiency, and 50% of sterile saline flow rate), and a 2-mm round diamond-coated tip was used to create the defect. External irrigation with sterile saline solution was provided in both groups. In Group III, the Er,Cr:YSGG laser was used (Waterlase; Biolase, San Clemente, CA, USA), with a wavelength of 2.78 μm , set at a power of 3.0 W and a frequency of 20 Hz (140-150 μs) and 50% water/air spray. The G4 tip (600 μm diameter and 4 mm length) was used in noncontact mode (2 mm in distance) and maintained in a perpendicular position to the irradiated surface to create the 2-mm bony defect previously delimited by a surgical pencil. After osteotomy, a machined titanium implant with 4-mm length and 2.2-mm diameter (Conexão Sistema de Próteses, Arujá, Brazil) was placed in the defect created in each group. Soft tissue was sutured with 4–0 nylon (Ethicon, Division of Johnson & Johnson Medical Limited, São Jose dos Campos, São Paulo, Brazil). All procedures were performed by the same surgeon, previously trained.

After surgery, animals received a single intramuscular dose of penicillin and streptomycin (0.1 mL/Kg of body weight) (Pentabiotic Pequeno Porte, Fort Dodge, Campinas, São Paulo, Brazil) and a gavage of acetaminophen (15 mg/Kg of body weight) (Paracetamol-Medley[®], Campinas, Brazil). Forty-eight animals per group were sacrificed by an overdose of anaesthetic (ketamine - Vyrbaxil, Virbac do Brazil Ind. Com. Ltda., São Paulo, Brazil) at zero, 3, 7, 14, 30, and 60 postoperative days, 8 animals per time-point.

Hard tissue histology

In this analysis, the left tibiae containing the implants were prepared after dehydration by a series of ethanol solutions and embedded in methacrylate-based resin (Technovit 7200;

Heraeus Kulzer, Wehrheim, Hesse, Germany). The specimens were dissected and delimited, and the bone blocks containing the implants were then sectioned at about 150 mm with a specific system (EXAKT Apparatebau GmbH & Co., Norderstedt, Germany) and subjected to grinding and polishing (EXAKT Apparatebau GmbH & Co.) to achieve a final thickness of approximately 50 μm . After that, the sections were stained with Stevenel's blue/acid fuchsin (1%) and referred for light microscopic evaluation. Measurements of the percentages of Bone-Implant Contact (BIC) and Bone Area Fraction Occupancy (BAFO) were performed by a blind and calibrated examiner on both sides of the implants, at the two first threads, at 100X magnification (Leica DM1200M; Leica Microsystems, Wetzlar, Hessen, Germany) with ImageJ 1.410 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The mean value of both sides of the implant was considered as a biological replicate.

Torque removal analysis

Immediately after the animals were sacrificed, torque removal analysis was undertaken in the right tibial implant in all animals at each time-point in the three groups. The tibial implant was attached to a calibrated digital torque meter with a scale range of 0 to 147.1 N.cm and divisions of 0.1 N.cm (Torque Meter - Instrutherm[®], São Paulo-SP, Brasil). A wrench was attached to the implant head to apply torque in the reverse direction of implant placement, until complete rupture of the bone-implant interface, signaled by the rotation of the implant.

Statistical analysis

The data were evaluated by means of the GraphPad Prism 5.0 software package (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). The normality of the data was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. The difference among the groups for parametric data was evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test defined by p values < 0.05 .

Results

In general, the three tested devices were easily handled, and implant sites were created with no significant difficulties. Whilst osteotomy was performed with no contact in the laser group, minimal load was applied to the working tip in the piezosurgery group, so that higher cutting efficiency could be achieved without overheating. The amount of time needed for implant bed preparation was, on average, 0.5, 1.5, and 2.0 minutes for the Drill, Piezosurgery, and Laser groups, respectively. The operating field remained clean and almost free of blood during the cutting procedure with both laser and piezosurgery. All implants presented primary stability at the time of placement.

BIC and BAFO

Qualitative evaluation of bone healing around the implant showed direct bone contact for the three groups at all time-points (Fig. 1). At immediate sacrifice (time-point zero), histological observation showed intimate bone contact between implant surface and defect edge in all groups, with no detectable differences among the groups in BIC or BAFO measurements. In the drill group at days zero and 3, bone chips from drilling were observed filling the spaces between threads in some specimens; this was not observed in the piezosurgery and laser groups. Up to 7 days, woven bone formation could not be observed between the implant threads for any of the 3 groups. At 7 and 14 days, connective tissue and newly formed woven bone were observed inside the implant's healing chambers and in direct contact with the implant surface. At later time-points, variable amounts of lamellar bone-filled implant threads could be seen in intimate contact with the implant surface in all groups.

Temporal differences in bone formation were observed *in vivo* when each group was analysed individually (Fig. 2). The drill and laser groups presented a significant increase in BIC between zero and 7 days ($p < 0.05$), whereas the piezosurgery group had a significant

increase only at 14 days ($p < 0.05$). In the drill group, the BIC and BAFO percentages observed at 7 days increased slightly at the subsequent time-points, with no statistically significant difference. In contrast, bone around the implants placed in defects produced by the laser and piezosurgery increased progressively from 14 to 60 days ($p < 0.05$) in both analyses.

Comparison among groups along the time-points presented differences in BIC and BAFO percentages (Fig. 3). At 3 days, the laser group showed a trend toward higher BIC compared to the other groups. The same pattern was also observed for BAFO percentage and was confirmed by statistical analysis ($p < 0.05$). At the late time-points, values of BIC and BAFO had progressively increased in all groups. The piezosurgery group had higher bone-to-implant contact at 60 days when compared to the drill group ($p < 0.05$), and, despite the lack of statistical evidence, the BAFO main percentage was higher at 14, 30, and 60 days in this group compared to the drill and laser groups.

Torque removal

Values of torque removal showed significant differences, indicating an increase in overall implant stability as a function of time. The effect of osteotomy technique on torque removal is presented in Figs. 4 and 5. The mean torque removal values observed in all groups demonstrated a trend toward decreasing from zero to 7 days (Fig. 4). Individual analysis of each group showed a significant increase in torque removal from 7 to 14 days in the piezosurgery and laser groups ($p < 0.01$). In contrast, a statistically significant increase was observed in the drill group between 14 and 30 days ($p < 0.001$). Finally, between 30 and 60 days, a significant increase in torque removal was observed only in the piezosurgery group ($p < 0.001$).

Direct comparison of torque removal among groups did not show statistically significant differences over time, except at 30 days, when the laser group presented higher mean torque value (4.22 N.cm²) than the piezosurgery group (2.85 N.cm²; $p < 0.05$) (Fig. 5).

Discussion

The present study was designed to assess the influence of implant bed preparation by conventional drills, piezosurgery, and Er,Cr:YSGG laser. We hypothesised that implant bed preparation by laser and ultrasound has potential advantages compared to preparation with conventional rotary drills, due to the characteristics of osteotomies as demonstrated in previous investigations (Kimura et al. 2001, Vercellotti et al. 2005, Wang et al. 2005, Lee et al. 2010, Perussi et al. 2012, Esteves et al. 2013). To test our hypothesis, we used osteotomy instruments to create defects in rat tibiae followed by placement of machined surface implants to study differences in the process of osseointegration. The experimental rat model has been described in the literature for the study of osseointegration with several experimental variables (de Morais et al. 2009, Conte Neto et al. 2013, Giro et al. 2014). Despite the lack of trabecular bone, the cortical portion of the tibia is identical for all specimens and ensures primary stability of the implant, allowing for the analysis of bone healing around implant threads, as demonstrated in our results.

All three pieces of equipment tested are easily manageable, and the time spent to create an osteotomy was higher for the laser, followed by piezosurgery and the drill. Cooling systems for piezosurgery and the Laser are highly efficient. In addition to cooling of the cutting area, blood and small fragments of bone are essentially washed away from the surgical field, as described by Schlee et al. (2006) and Leclercq et al. (2008). Moreover, both piezosurgery and the laser demonstrated efficient bleeding control. The hemostatic mechanism of the laser lies in thermocoagulation of blood vessels, and it has been suggested

that the cavitation effect is the reason for the hemostatic ability of piezosurgery (Landes et al. 2008, von See et al. 2012). Cavitation is the disruption of the molecular cohesion of liquids produced by ultrasonic waves. Zones of depression are formed in the liquid structure that is filled with vapor-forming bubbles about to implode (Leclercq et al. 2008).

The piezoelectric system has been used in clinical practice for implant bed preparation; however, the laser-based systems available today are not suitable for such applications. Indeed, in a laser osteotomy, in contrast to drills and piezosurgery instruments, direct contact is not applied to the bone; thus, the surgeon must draw the osteotomy essentially freehand. Moreover, laser ablation ability is decreased the farther the area of light incidence is from the source. Schwarz et al. (2007) reported decreased efficiency of bone ablation at the bottom of the osteotomy in implant sites prepared with the Er:YAG laser in dog mandibles. In our study, this was not evident, because rat tibiae are thin, and the laser could easily penetrate the bone. Thus, the minimal ability of the laser to produce deep defects, coupled with the small diameter of the sapphire crystal used (600 μm in diameter and 4 mm in length), makes it difficult to create the three-dimensional uniform osteotomy required for dental implant placement.

Histomorphometric evaluation over time showed that bone regeneration around the implants among the groups was similar to that at 60 days. Defects produced by laser, piezosurgery, and drill allowed for mechanical imbrication between the implant and cortical bone, providing primary stability. Schwarz et al. (2007) prepared implant sites in dogs using the Erbium:yttrium-aluminum-garnet (Er:YAG) laser, a similar device from the Erbium laser family, but with a less specific wavelength for water and hydroxyapatite compared to that of the Er,Cr:YSGG laser. Primary stability of implants placed in a laser-prepared alveolus was reduced, according to the authors, because the bone ablation needed for the insertion of 3.8-mm-diameter by 11-mm-long implants was too deep for accurate control of the osteotomy

design as mentioned above. In our study, the similarity among the groups in terms of primary stability was confirmed by torque removal values at immediate sacrifice, when no statistically significant differences were detected among the groups ($p > 0.05$). Analysis of these data indicates that all devices were precise for creation of a 2-mm-diameter osteotomy.

The change between primary and secondary stability occurs as original bone is resorbed and newly formed bone takes its place between the implant threads. The overall stability of the implant has been suggested to decrease the most during the transition from primary (mechanical) to secondary (biological). The process of remodeling increases the stiffness of the bone around the implant, and the bony interlock with the surface prevents micro-movement and the formation of fibrous scar tissue at the time of implant loading (Davies 1998, 2003). The torque removal test evaluates the strength of the bone/implant interface, which, in turn, is related to how much bone exists at this interface and how mature or mineralised it is (Sennerby & Meredith, 2008). In this context, it is possible to deduce from our results that the transition between primary and secondary stability began between 7 and 14 days for all groups. Previous studies have demonstrated that, up to 14 days in the rat model, healing of bone defects consists essentially of immature bone, regardless of the type of instrument used to create it (Salina et al. 2006, Perussi et al. 2012, Esteves et al. 2013). Nevertheless, despite the absence of statistically significant differences among the groups, our results demonstrated a trend toward increased mean values of torque removal for the piezosurgery and laser groups at 14 days compared to the drill group (Fig. 5). In contrast, the drill group presented an earlier increase in BIC and BAFO percentages up to 14 days; however, values of torque removal were significantly increased only at the 30- and 60-day time-points ($p < 0.001$). This is probably explained by the degree of maturation of newly formed bone. Even though new bone was present between the implant threads and in contact with it, it was not mature enough to resist the removal force.

When bone formation around the implants was analysed, the laser and piezosurgery groups presented a gradual increase in BIC and BAFO percentages, even at 30 and 60 days (Fig. 2), which means that bone formation, in contrast to that in the drill group, also occurred at later time-points, when the piezosurgery group reached the highest BIC values at 60 days ($p < 0.05$). Analysis of these data corroborates the histomorphometric results of previous studies that found higher bone neof ormation in defects produced by piezosurgery (Esteves et al. 2013) and laser (Perussi et al. 2012) at late time-points when compared to that in defects produced by conventional drilling. Da Silva Neto et al. (2014) also reported a remarkable increase in ISQ between the later periods (90 to 150 days) in implants placed in surgical sites prepared by piezosurgery.

In the present experimental model, our results indicate that osteotomies produced by laser and piezosurgery are histologically and biomechanically suitable for implant osseointegration. At 60 days, and values of BIC, BAFO, and torque removal were comparable among the groups. Despite good reparative features, improvements in the technical characteristics of high-power lasers are necessary to make them suitable for such applications.

In conclusion, implant bed preparation by the Er,Cr:YSGG laser and piezosurgery is comparable to that by conventional drilling and allows for implant osseointegration. Temporal features of bone repair demonstrated early bone neof ormation and later secondary stability in the drill group, whilst the piezosurgery and laser groups showed continuous increases in bone formation until the later time-points, along with earlier secondary implant stability.

Acknowledgment: This work was supported by a grant from FAPESP (2010/16645-2, 2010/07712-8). The authors also thank the company Conexão Sistema de Próteses[®] that provided the mini-implants used in this study.

References

- Bengazi, F., Lang, N.P., Canciani, E., Viganò, P., Velez, J.U. & Botticelli, D. (2012) Osseointegration of implants with dendrimers surface characteristics installed conventionally or with Piezosurgery(®) . A comparative study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **25**: 10–15.
- Claire, S., Lea, S.C. & Walmsley, A.D. (2013) Characterisation of bone following ultrasonic cutting. *Clinical Oral Investigations* **17**: 905–912.
- Conte Neto, N., de Andrade, C.R., Spolidorio, L.C., Planeta, C.D., Cruz, F.C., de Souza Bastos, A. & Marcantonio, E., Jr. (2013) Effects of chronic stress and alendronate therapy on the osseointegration of titanium implants. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* Feb 28.
- Cordioli, G. & Majzoub, Z. (1997) Heat generation during site preparation: an in vitro study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **12**:186-93.
- da Silva Neto, U.T., Joly, J.C., Gehrke, S.A. (2014) Clinical analysis of the stability of dental implants after preparation of the site by conventional drilling or piezosurgery. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **52**: 149–153.
- Davies, J.E. (1998) Mechanisms of endosseous integration. *International Journal of Prosthodontics* **11**: 391–401.
- Davies, J.E. (2003) Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of Dental Education* **67**: 932–949.
- de Morais, J.A., Trindade-Suedam, I.K., Pepato, M.T., Marcantonio, E. Jr., Wenzel, A. & Scaf, G. (2009) Effect of diabetes mellitus and insulin therapy on bone density around osseointegrated dental implants: a digital subtraction radiography study in rats. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 796–801.

Deppe, H. & Horch, H.H. (2007) Laser applications in oral surgery and implant dentistry. *Lasers in Medical Science* **22**: 217–221.

Ercoli, C., Funkenbusch, P.D., Lee, H.J., Moss, M.E., Graser, G.N. (2004) The influence of drill wear on cutting efficiency and heat production during osteotomy preparation for dental implants: a study of drill durability. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **19**: 335–339.

Esteves, J.C., Marcantonio, E. Jr., de Souza Faloni, A.P., Rocha, F.R., Marcantonio, R.A., Wilk, K., Intini, G. (2013) Dynamics of bone healing after osteotomy with piezosurgery or conventional drilling - histomorphometrical, immunohistochemical, and molecular analysis. *Journal of Translational Medicine*. **23**:221.

Eversole, L.R. & Rizoiu, I.M. (1995) Preliminary investigations on the utility of an erbium, chromium YSGG laser. *Journal of the California Dental Association* **23**: 41–47.

Giro, G., In, J., Witek, L., Granato, R., Marin, C., Coelho, P.G., Ramacciato, J.C. & Lopes Motta, R.H. (2014) Amoxicillin administrations and its influence on bone repair around osseointegrated implants. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **72**: 305.e1-305.e5.

Harashima, T., Kinoshita, J., Kimura, Y., Brugnera, A., Zanin, F., Pecora, J.D., Matsumoto, K. (2005) Morphological comparative study on ablation of dental hard tissues at cavity preparation by Er:YAG and Er,Cr:YSGG lasers. *Photomedicine and Laser Surgery* **23**: 52–55.

Kimura, Y., Yu, D.G., Fujita, A., Yamashita, A., Murakami, Y. & Matsumoto, K. (2001) Effects of erbium,chromium:YSGG laser irradiation on canine mandibular bone. *Journal of Periodontology* **72**: 1178–1182.

Landes, C.A., Stübinger, S., Rieger, J., Williger, B., Ha, T.K. & Sader, R. (2008) Critical evaluation of piezoelectric osteotomy in orthognathic surgery: operative technique, blood

loss, time requirement, nerve and vessel integrity. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **66**: 657–674.

Leclercq, P., Zenati, C., Amr, S. & Dohan, D.M. (2008) Ultrasonic bone cut. Part 1: State-of-the-art technologies and common applications. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **66**: 177–182.

Lee, S.Y., Piao, C., Heo, S.J., Koak, J.Y., Lee, J.H., Kim, T.H., Kim, M.J., Kwon, H.B. & Kim, S.K. (2010) A comparison of bone bed preparation with laser and conventional drill on the relationship between implant stability quotient (ISQ) values and implant insertion variables. *Journal of Advanced Prosthodontics* **2**: 148–153.

Nordera, P., Spanio di Spilimbergo, S., Stenico, A., Fornezza, U., Volpin, L. & Padula, E. (2007) The cutting-edge technique for safe osteotomies in craniofacial surgery: the piezosurgery bone scalpel. *Plastic and Reconstructive Surgery* **120**: 1989–1995.

Pappalardo, S. & Guarnieri, R. (2013) Randomized clinical study comparing piezosurgery and conventional rotatory surgery in mandibular cyst enucleation. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery* Aug 7. doi: 10.1016/j.jcms.2013.06.013. [Epub ahead of print]

Perussi, L.R., Pavone, C., Oliveira, G.J.P.L., Cerri, O.S. & Marcantonio, R.A.C. (2012) Effects of the Er,Cr:YSGG laser on bone and soft tissue in a rat model. *Lasers in Medical Science* **27**: 95–102.

Preti, G., Martinasso, G., Peirone, B., Navone, R., Manzella, C., Muzio, G., Russo, C., Canuto, R.A. & Schierano, G. Cytokines and growth factors involved in the osseointegration of oral titanium implants positioned using piezoelectric bone surgery versus a drill technique: a pilot study in minipigs. *Journal of Periodontology* **78**: 716–722.

Queiroz, T.P., Souza, F.A., Okamoto, R., Margonar, R., Pereira-Filho, V.A., Garcia Júnior, I.R. & Vieira, E.H. (2008) Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after

implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis.

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery **66**: 1233–1240.

Rashad, A., Sadr-Eshkevari, P., Weuster, M., Schmitz, I., Prochnow, N. & Maurer, P. (2013)

Material attrition and bone micromorphology after conventional and ultrasonic implant site

preparation. *Clinical Oral Implants Research* 24(Suppl A)100:110–4. doi: 10.1111/j.1600-

0501.2011.02389.x.

Saha, S., Pal, S. & Albright, J.A. (1982) Surgical drilling: design and performance of an

improved drill. *Journal of Biomechanical Engineering* **104**: 245–252.

Salina, S., Maiorana, C., Iezzi, G., Colombo, A., Fontana, F. & Piattelli, A. (2006)

Histological evaluation, in rabbit tibiae, of osseointegration of mini-implants in sites prepared

with Er:YAG laser versus sites prepared with traditional burs. *Journal of Long-Term Effects*

of Medical Implants **16**: 145–156.

Schlee, M., Steigmann, M., Bratu, E. & Garg, A.K. (2006) Piezosurgery: basics and

possibilities. *Implant Dentistry* **15**: 334–340.

Schwarz, F., Olivier, W., Herten, M., Sager, M., Chaker, A. & Becker, J. (2007) Influence of

implant bed preparation using an Er:YAG laser on the osseointegration of titanium implants:

a histomorphometrical study in dogs. *Journal of Oral Rehabilitation* **34**: 273–281.

Sennerby, L. & Meredith, N. (2008) Implant stability measurements using resonance

frequency analysis: biological and biomechanical aspects and clinical implications.

Periodontology 2000 **47**: 51–66.

Shelley, E.D. & Shelley, W.B. (1986) Piezosurgery: a conservative approach to encapsulated

skin lesions. *Cutis* **38**: 123–126.

Sortino, F., Pedulla, E. & Masoli, V. (2008) The piezoelectric and rotatory osteotomy

technique in impacted third molar surgery: comparison of postoperative recovery. *Journal of*

Oral and Maxillofacial Surgery **66**: 2444–2448.

- Stübinger, S., Biermeier, K., Bächli, B., Ferguson, S.J., Sader, R. & von Rechenberg, B. (2010) Comparison of Er:YAG laser, piezoelectric, and drill osteotomy for dental implant site preparation: a biomechanical and histological analysis in sheep. *Lasers in Surgical Medicine* **42**: 652–661.
- Vercellotti, T., Nevins, M.L., Kim, D.M., Nevins, M., Wada, K., Schenk, R.K. & Fiorellini, J.P. (2005) Osseous response following resective therapy with piezosurgery. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **25**: 543–549.
- von See, C., Gellrich, N.C., Rucker, M., Kokemüller, H., Kober, H. & Stöver, E. (2012) Investigation of perfusion in osseous vessels in close vicinity to piezo-electric bone cutting. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **50**: 251-255.
- Wang, X., Zhang, C. & Matsumoto, K. (2005) In vivo study of the healing processes that occur in the jaws of rabbits following perforation by an Er,Cr:YSGG laser. *Lasers in Medical Science* **20**: 21–27.
- Yim, M. & Demke, J. (2012) Latest trends in craniomaxillofacial surgical instrumentation. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* **20**: 325–332.

Graphics and Figures

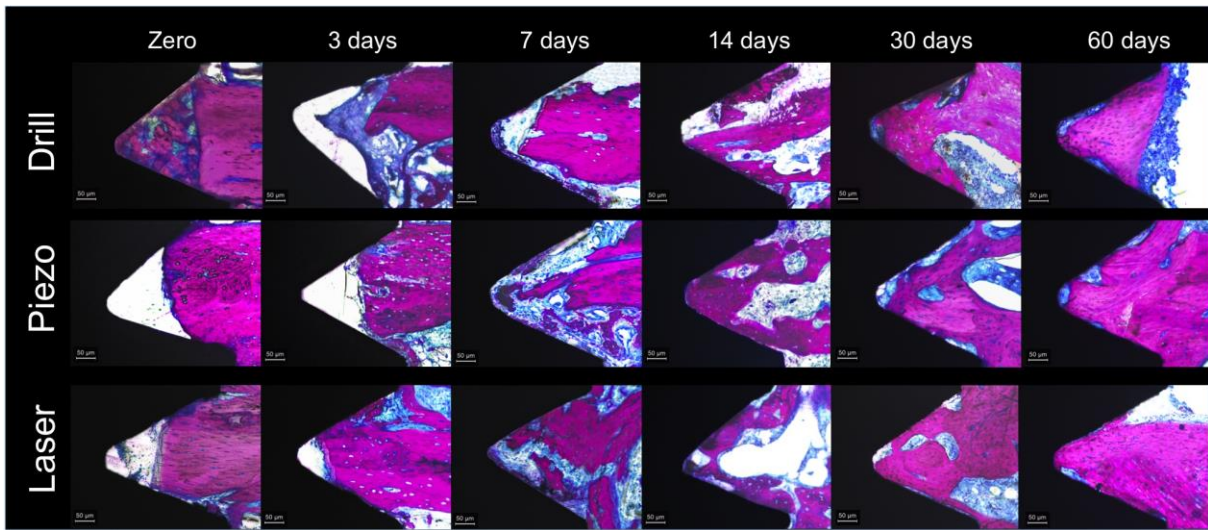


Fig. 1. Hard Tissue Histology: Histological aspect of healing chamber illustrated by longitudinal sections stained with Stevenel's Blue and Acid Fuchsin. Bone healing exhibits a replacing pattern where the tibia cortical is resorbed and neofomed bone takes place in the implants threads.

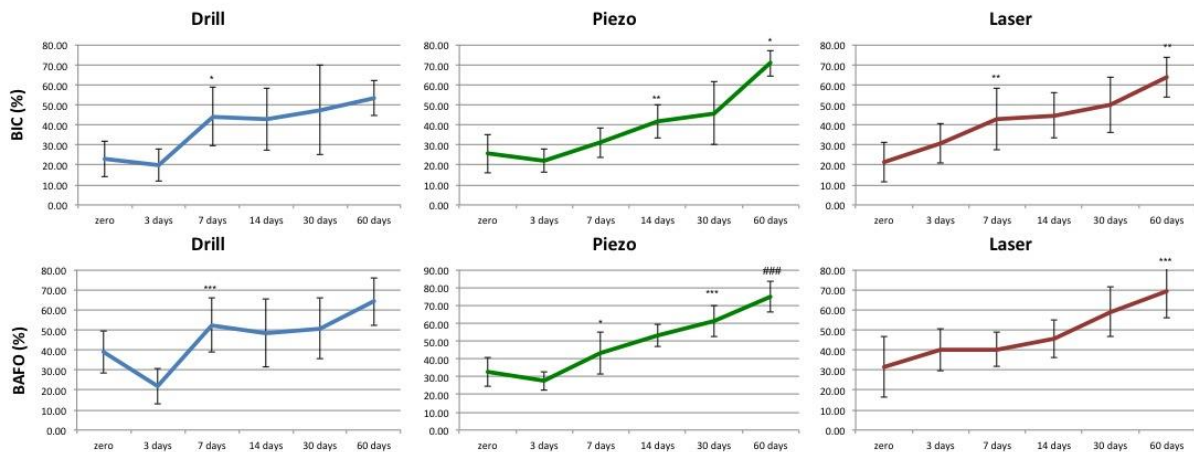


Fig. 2. Graphic representation of mean %BIC (Bone-to-Implant Contact percentage), mean %BAFO (Bone Area Fraction Occupancy percentage), and standard deviation (error bars) as a function of time in vivo. BIC: drill group, * $p < 0.05$ in relation to day zero; piezosurgery group, * $p < 0.05$ in relation to zero and 3 days, and ### $p < 0.05$ in relation to 30 days; and

laser group, $*p < 0.05$ in relation to day zero, and $*p < 0.05$ in relation to 14 days. BAFO: drill group, $***p < 0.001$ in relation to 3 days; piezosurgery group, $*p < 0.05$ in relation to 3 days; and laser group, $**p < 0.01$ in relation to 14 days.

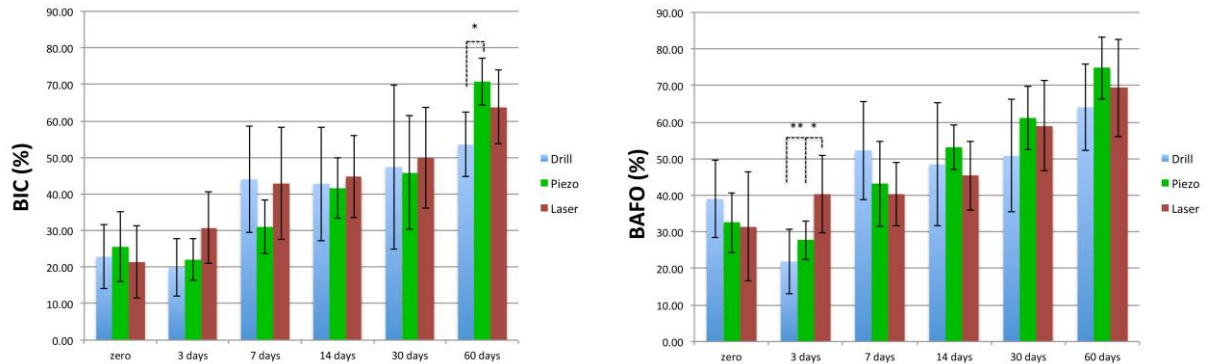


Fig. 3. Mean %BIC and BAFO. Comparison among groups. BIC: *Statistically significant difference between the drill and piezosurgery groups ($p < 0.05$). BAFO: **Statistically significant difference between the laser and drill groups ($p < 0.01$). *Statistically significant difference between the laser and piezosurgery groups ($p < 0.05$).



Fig. 4. Graphic representation of mean torque removal and standard deviation (error bars) as a function of time in vivo. Drill group: $***p < 0.001$ in relation to 14 days, and $###p < 0.001$ in relation to 14 days. Piezosurgery group: $**p < 0.01$ in relation to 7 days, and $***p < 0.001$ in relation to 30 days. Laser group: $**p < 0.01$ in relation to 7 days, and $***p < 0.001$ in relation to 14 days.

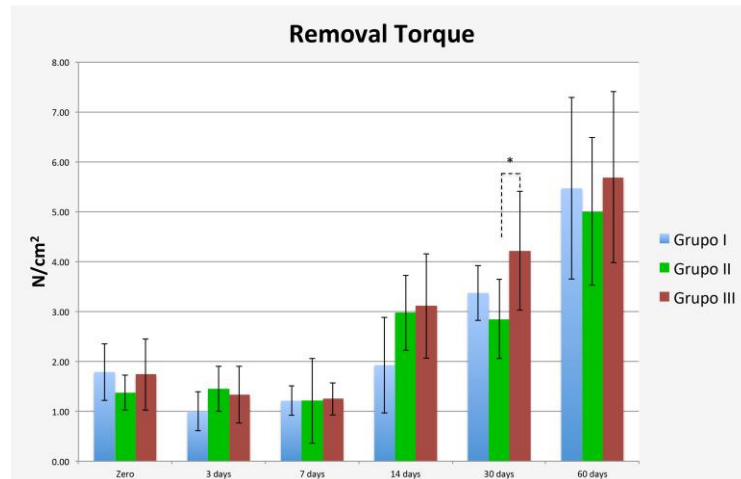


Fig. 5. Mean torque removal, comparison among groups. *Statistically significant difference between the laser and piezosurgery groups ($p < 0.05$).

Estudo 2

Artigo 1

Dynamics of bone healing after osteotomy with piezosurgery or conventional drilling – histomorphometrical, immunohistochemical, and molecular analysis*

Autores:

Jônatas Caldeira Esteves*

Elcio Marcantonio Jr*

Ana Paula de Souza Faloni**

Fernanda Regina Godoy Rocha*

Rosemary Adriana Marcantonio*

Katarzyna Wilk[#]

Giuseppe Intini[#]

*UNESP-Univ Estadual Paulista, School of Dentistry, Department of Diagnosis and Surgery, Division of Periodontology, Rua Humaitá 1680, 14801-903 Araraquara-SP/Brazil

** UNIARA – Centro Universitário de Araraquara, Department of Health Sciences – Dental School, Avenida Maria Antônia Camargo de Oliveira, 179, Bairro Visa Suconasa, Araraquara-SP, CEP 14807-120.

[#] Harvard School of Dental Medicine, Harvard University, Department of Oral Medicine, Infection, and Immunity. 188 Longwood Ave, Boston, MA 02115 – REB 403, USA

Correspondence:

Giuseppe Intini, giuseppe_intini@hsdm.harvard.edu

188 Longwood Ave, Boston, MA 02115 – REB 403, USA

*Artigo publicado no periódico *Journal of Translational Medicine*

Dynamics of bone healing after osteotomy with piezosurgery or conventional drilling – histomorphometrical, immunohistochemical, and molecular analysis

Jônatas Caldeira Esteves^{1,4}, Elcio Marcantonio Jr², Ana Paula de Souza Faloni³, Fernanda Regina Godoy Rocha¹, Rosemary Adriana Marcantonio¹, Katarzyna Wilk⁴ and Giuseppe Intini^{4,5*}

Abstract

Background: Piezosurgery is an osteotomy system used in medical and dental surgery. Many studies have proven clinical advantages of piezosurgery in terms of quality of cut, maneuverability, ease of use, and safety. However, few investigations have tested its superiority over the traditional osteotomy systems in terms of dynamics of bone healing. Therefore, the aim of this study was to evaluate the dynamics of bone healing after osteotomies with piezosurgery and to compare them with those associated to traditional bone drilling.

Methods: One hundred and ten rats were divided into two groups with 55 animals each. The animals were anesthetized and the tibiae were surgically exposed to create defects 2 mm in diameter by using piezosurgery (Piezo group) and conventional drilling (Drill group). Animals were sacrificed at 3, 7, 14, 30 and 60 days post-surgery. Bone samples were collected and processed for histological, histomorphometrical, immunohistochemical, and molecular analysis. The histological analysis was performed at all time points (n = 8) whereas the histomorphometrical analysis was performed at 7, 14, 30 and 60 days post-surgery (n = 8). The immunolabeling was performed to detect Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Caspase-3 (CAS-3), Osteoprotegerin (OPG), Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B Ligand (RANKL), and Osteocalcin (OC) at 3, 7, and 14 days (n = 3). For the molecular analysis, animals were sacrificed at 3, 7 and 14 days, total RNA was collected, and quantification of the expression of 21 genes related to BMP signaling, Wnt signaling, inflammation, osteogenic and apoptotic pathways was performed by qRT-PCR (n = 5).

Results: Histologically and histomorphometrically, bone healing was similar in both groups with the exception of a slightly higher amount of newly formed bone observed at 30 days after piezosurgery (p < 0.05). Immunohistochemical and qRT-PCR analyses didn't detect significant differences in expression of all the proteins and most of the genes tested.

Conclusions: Based on the results of our study we conclude that in a rat tibial bone defect model the bone healing dynamics after piezosurgery are comparable to those observed with conventional drilling.

Keywords: Piezosurgery, Bone healing, Osteotomy system, Bone surgery, Bone drilling

* Correspondence: Giuseppe_Intini@hsdm.harvard.edu

⁴Department of Oral Medicine, Infection, and Immunity, Harvard School of Dental Medicine – Harvard University, 188 Longwood Avenue, Boston, MA 02115 – REB 403, USA

⁵Harvard Stem Cell Institute, Cambridge, MA, USA

Full list of author information is available at the end of the article

Resumo

Contexto: A piezocirurgia é um sistema de osteotomia utilizado em cirurgias médicas e odontológicas. Muitos estudos clínicos têm comprovado as vantagens da piezocirurgia em termos de qualidade de corte, manuseabilidade, facilidade de uso e segurança. Entretanto, poucos investigadores tem testado sua superioridade sobre os sistemas tradicionais de osteotomia em termos de dinâmicas de cicatrização óssea. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar as dinâmicas de reparo ósseo após osteotomias realizadas com cirurgia piezoelétrica e compará-las com a fresagem óssea tradicional.

Métodos: Cento e dez ratos foram divididos em dois grupos com 55 animais cada. Os animais foram anestesiados e as tíbias foram cirurgicamente expostas para criar um defeito de 2 milímetros de diâmetro utilizando cirurgia piezoelétrica (Grupo Piezo) e fresas convencionais (Grupo Fresa). Os animais foram sacrificados aos 3, 7, 14, 30 e 60 dias após a cirurgia. Amostras de osso foram coletadas e processadas para análises histomorfométrica, imunohistoquímica e molecular. A análise histomorfométrica foi executada em todos os períodos de avaliação (n = 8). Imunomarcagem foi realizada para detecção de VEGF, CAS-3, OPG, RANKL and OC aos 3, 7 e 14 dias (n = 3). Para a análise molecular os animais foram sacrificados aos 3, 7 e 14 dias, RNA total foi coletado e procedeu-se à quantificação da expressão de 21 genes relacionados à via de sinalização BMP, via de sinalização Wnt, vias inflamatórias, osteogênicas e apoptóticas por meio de qRT-PCR (n = 5).

Resultados: Histológica e histomorfometricamente a cicatrização óssea foi similar em ambos os grupos à exceção de uma neoformação óssea discretamente maior observada aos 30 dias no grupo piezo ($p < 0.05$). As análises imunohistoquímica e por qRT-PCR não detectaram diferenças significantes entre todas as proteínas e genes testados.

Conclusão: Baseado nos resultados de nosso estudo nós concluímos que em um modelo de tibia de rato a dinâmica de cicatrização óssea após piezocirurgia é comparável àquela observada com fresas convencionais.

Background

Hard tissue cutting is a common procedure in the medical and dental fields, especially during orthopaedic, maxillofacial, and periodontal surgeries. Traditionally, rotating instruments such as burs have been used for osseous surgery. However, disadvantages are related to the use of these traditional systems, including bone overheating and damage to adjacent tissues [1,2]. Piezosurgery has been introduced as a valuable alternative to avoid disadvantages associated to the traditional rotating instruments.

Piezosurgery is performed by means of a device that uses microvibration at a frequency capable of cutting bone. Its mechanism of action is based on the ability of certain ceramics and crystals to deform when an electric current is passed across them, resulting in microvibration at ultrasonic frequency [3,4]. The vibration is then applied to a nitride-hardened or diamond-coated insert which moves at 25 – 30 KHz, a frequency that allows for selective cut of bone tissue [5]. Since its approval for commercial use in 2002, piezosurgery has been successfully utilized for many surgical procedures, such as maxillary sinus lifting [6], autologous bone graft harvesting [7], bone splitting [8], lateralization of the inferior alveolar nerve [9], and orthognathic and neurologic surgeries [5,10,11].

Clinical and pre-clinical studies combined with in vitro studies have shown that piezosurgery produces clean and precise osteotomies with smooth walls and decreased bleeding [12,13]. Maurer et al. [14] evaluated the

micromorphological differences after using three osteotomy techniques and observed that different from rotary drilling and saw, ultrasonic piezoelectric osteotomy preserved the original structure of the bone.

Few works however have studied the process of bone healing after piezosurgery and compared it to the bone healing that follows after osteotomy by traditional methods. A purely histological description was provided by Horton et al. [15]. These investigators described accelerated bone formation in alveolar defects generated by chisel and ultrasonic instrument in comparison to traditional drill. Later, Vercellotti et al. [16] evaluated the level of the alveolar bone crest after osteotomy with piezosurgery and burs in alveolar ridges of dogs. Histological analysis showed a bone level gain in the group treated with piezosurgery and bone loss in the diamond and carbide bur groups. A recent histomorphometrical study conducted by Ma et al. [17] compared the bone healing after osteotomies performed by piezosurgery versus osteotomies performed with oscillatory saws. They found no statistically significant differences in terms of histomorphometry. However, the authors found a higher degree of formation of vascularized tissues, of provisional matrix, and of bone remodeling activity at 7 and 14 days after use of piezoelectric surgery. The only in vivo study that combined histomorphometrical and molecular analysis was conducted by Preti et al. [18]. This group of investigators evaluated the level of osseointegration of titanium implants placed in surgical bed prepared with

piezosurgery versus conventional drilling in tibiae of minipigs. They observed lower number of inflammatory cells, higher number of osteoblasts, increased expression of BMP-4 and TGF- β 2, and lower expression of proinflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-10 in the piezosurgery group at 7 and 14 days after osteotomy.

Despite the extensive clinical use and proven efficacy of piezosurgery as an osteotomy system, the data presented in the literature to date does not provide a conclusive answer on whether piezosurgery presents with clear advantage over the traditional osteotomy systems with respect to bone healing acceleration. Data by Preti et al. [18] indicate that piezosurgery may accelerate the earlier phases of the implant osseointegration when compared to traditional drilling; however, a comprehensive study that evaluates and compares the bone healing process of a bone defect created with piezosurgery or other traditional systems is still missing. Thus, the aim of this study was to evaluate the dynamics of bone healing after piezosurgical and drilling osteotomy in bone defects. Our study hypothesized that bone healing after piezoelectric osteotomy is faster due to early enhanced expression of growth factors in comparison to conventional drilling. In order to test this hypothesis, the healing process of a subcritical bone defect was analyzed by histology and histomorphometry, immunohistochemistry (IHC), and genetic expression analysis of

osteoblast differentiation regulators, osteogenic markers, inflammatory cytokines, and apoptotic factors. Our multifactorial analysis shows no significant differences in speed and quantity of bone regeneration when comparing piezosurgery over traditional drilling.

Methods

Animal studies

Ethical board approval was obtained for this study by the Ethics in Animal Research Committee of the School of Dentistry of Araraquara (UNESP, Brazil CEEA/FOAr 15/2010). One hundred and ten 3-month-old rats (*Rattus norvegicus albinus*, Holtzman) were used in this study. The rats were kept at a temperature of 22°C, in a 12 h light/dark cycle, with water and food ad libidum. After a 15-day acclimatization period, the animals were randomly assigned to the two experimental groups: Group I (Drill) and Group II (Piezo) with 55 rats each (Figure 1).

Surgical procedure

All the animals were submitted to the same surgical procedure under general anesthesia with a combination of xylazine (0.04 ml/100 g body weight)(Francotar, Virbac do Brazil Ind. Com. Ltda., São Paulo, Brazil) and ketamine (0.08 ml/g body weight)(Vyrbaxil, Virbac do Brazil Ind. Com. Ltda., São Paulo, Brazil). Preoperative

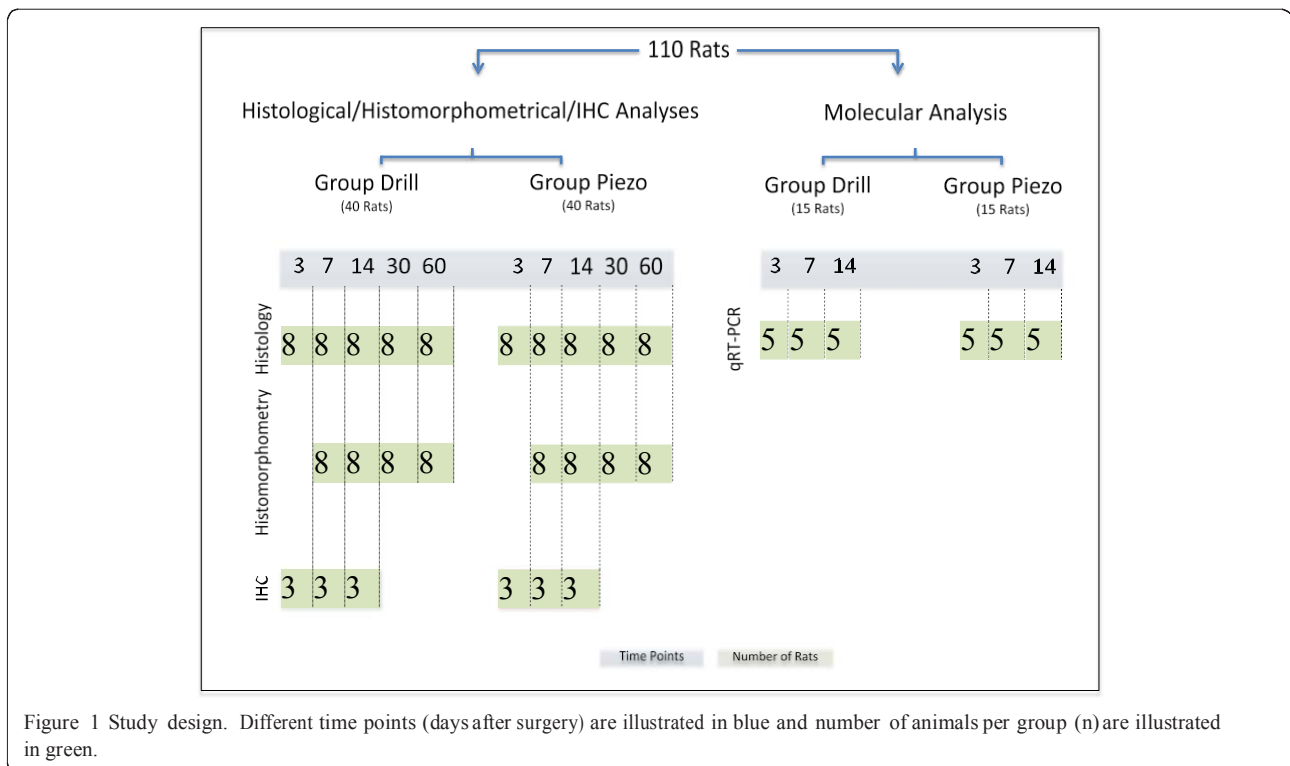


Figure 1 Study design. Different time points (days after surgery) are illustrated in blue and number of animals per group (n) are illustrated in green.

trichotomy of the inner region of the leg was performed and povidone iodine solution was applied to the surgical site to prevent possible sepsis. Next, an incision of approximately 20 mm in length was performed at the medial side of the right tibia, by the proximal metaphysis. Bone tissue was carefully exposed and a monocortical subcritical osteotomy of 2 mm in diameter was performed. For Group I, 2 mm in diameter drills were used to create the bone defect. For Group II a piezosurgery device – Piezo Master Surgery (EMS^W, Nyon, Switzerland) – was set for cortical bone osteotomy (–surgical” mode, maximal cutting efficiency and 50% of sterile saline flow rate) and a 2 mm round diamond-coated tip was used to create the defect. External irrigation with sterile saline solution was provided in both groups. To facilitate the subsequent tissue processing, radio-opaque gutta-percha pins were positioned at a distance of 2 mm from the osteotomy edges. Soft tissue was sutured with 4–0 nylon (Ethicon, Division of Johnson & Johnson Medical Limited, São Jose dos Campos, São Paulo, Brazil). All the procedures were performed by the same surgeon, previously trained. After surgery, animals received an intramuscular dose of penicillin and streptomycin (0.1 ml/Kg of body weight) (Pentabiotic Pequeno Porte, Fort Dodges, Campinas, São Paulo, Brazil) and a gavage of acetaminophen (15 mg/Kg of body weight) (Paracetamol-Medley®, Campinas, Brazil).

Collection of the samples

For histological, histomorphometric, and immunohistochemical (IHC) analysis tissues were collected at 3, 7, 14, 30 and 60 days post surgery (Figure 1, Histological/Histomorphometrical/IHC Analyses). More specifically, histology was performed on samples collected at 3, 7, 14, 30 and 60 days post surgery (n = 8) and histomorphometry was performed on samples collected at 7, 14, 30 and 60 days post surgery (n = 8). Immunohistochemical analysis was performed on tissues collected at 3, 7, and 14 days post surgery (n = 3). Block biopsies were harvested by collecting the treated area along with an additional 2 mm of surrounding tissue marked by the gutta-percha. Upon collection, tissue was fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours. The samples were then decalcified in EDTA buffered at pH 7.2 with 0.1 M sodium phosphate, embedded in paraffin, and cut into 4 µm sections along the longitudinal axes. For quantitative RT-PCR analysis, 5 animals per group were sacrificed at 3, 7 and 14 days after surgery (Figure 1, Molecular Analysis). Bone blocks were harvested by collecting the treated area along with the additional 2 mm of surrounding tissue marked by the gutta-percha. The bone blocks were quickly rinsed once in PBS and immediately preserved in RNA Later (Sigma-Aldrich Inc. Brasil) until quantitative RT-PCR was performed.

Histomorphometric analysis

The two most central histological sections of each bone defect were stained with hematoxylin and eosin for histomorphometric analysis. Standardized pictures were obtained with a digital camera (DSC295m, Leica Microsystems, Wetzlar Hessen, Germany) mounted on a microscope (Leica DM 2500, Leica Microsystems, Wetzlar Hessen, Germany). Images were analyzed using the Image J image analysis software [19] to quantify the bone neoformation. Analyses were repeated three different times at intervals of 1 week by the same blinded operator. Measurements were performed as follows: the total area (TA) to be analyzed was identified by delimiting the bone defect (2 mm in diameter) at 2 mm from the gutta-percha reference points and the newly formed bone area (NFBA or bone neoformation) was then delineated within the TA. The percentage of NFBA was calculated according to the following formula: $100 \times \text{NFBA}(\text{pixels})/\text{TA}(\text{pixels})$ and values were submitted to statistic analysis using analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc Tukey's test when the ANOVA suggested a significant difference among groups ($p < 0.05$).

Immunohistochemical analysis

Immunohistochemical staining for Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Caspase-3 (CAS-3), Osteoprotegerin (OPG), Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B Ligand (RANKL), and Osteocalcin (OC) was performed on 4-µm sections mounted on silanized slides (DAKO A/S, Glostrup, Denmark). Antigen retrieval for VEGF and CAS-3 detection was performed by incubation with 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0 at 70–75°C in a vapor cooker, for 30 min. Antigen retrieval for OC, OPG and RANKL was performed by incubation with 0.5% trypsin for 20 minutes at 37°C. All sections were treated with 3% hydrogen peroxidase in methanol for 30 minutes to block endogenous peroxidase activity. Afterward, sections were incubated with 3% bovine serum albumin in phosphate buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 30 minutes at room temperature to block nonspecific protein binding. Subsequently, slides were incubated overnight with primary antibodies specific for CAS-3 (Rabbit polyclonal antibody – Abcam, Inc. USA, cat # ab44976, dilution 1:400), VEGF (Rabbit polyclonal antibody – Abcam, Inc. USA, cat # ab46154, dilution 1:400), OPG (Rabbit polyclonal antibody – Abcam, Inc. USA, cat # ab73400, dilution 1:300), RANKL (Mouse polyclonal antibody – Santa Cruz Biotechnology Inc., USA, cat # sc-7628, dilution 1:200), and OC (Mouse monoclonal antibody – Abcam, Inc. USA, cat # ab13420, dilution 1:200). For negative controls, the immunohistochemistry was performed by replacing the incubation step with primary antibodies

with an incubation step with non-immune serum. Then, sections were incubated with biotinylated immunoglobulins (avidin-biotin complex, Universal LSAB 2 Kit/HRP kit, DAKO Inc., USA), and the reaction product was detected with an Avidin Biotin Peroxidase complex (ABC kit, DAKO Inc., USA) and stained with the chromogen substrate diaminobenzidine (Liquid DAB + Substrate Chromogen system, DAKO Inc., USA). Sections were counterstained with hematoxylin and examined by a calibrated examiner under light microscopy at x25 and x100 final magnifications. The quantification of the protein expression was performed by an ordinal qualitative analysis, following a previously published methodology [2,20]. Briefly, staining scores were categorized as follows: negative (-), positive (+), superpositive (++), and hyperpositive labels (+++). To perform a quantitative comparison, scores were then converted into percentile averages as follows: 0% (equivalent to —, negative staining), 20% (equivalent to —+, 10% to 30% total staining), 60% (equivalent to —++, 50% to 70% total staining), and 90% (equivalent to —+++, 80% to 100% total staining). Percentile averages of each protein were submitted to statistical analysis using the non-parametric Mann–Whitney test, comparing the Drill group and the Piezo group at each time point. Significant difference between the groups was defined by p values < 0.05. Expression analyses of VEGF, RANKL, OPG, and OC were performed within the margins of the created defect. Expression analysis of Caspase-3 also included the scoring of bone areas surrounding the margins of the defect (2 mm).

Quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from bone samples using a Trizol reagent (Life Technologies Inc, USA) according to the manufacturer's protocol. Complementary DNA was synthesized by reverse transcription of 1 µg of total RNA using oligo (dT) as primers (High Capacity cDNA synthesis kit, Applied Biosystems, Warrington, UK). Real-time quantitative PCR was conducted under standard enzyme and cycling conditions on a StepOne system (Life Technologies Inc, USA), using custom-designed real-time assays (Universal Probe Library - Roche, Indianapolis, USA). According to the manufacturer's instructions, reactions were performed in 10 µL triplicates for each target cDNA. Data was analyzed using a comparative $\Delta\Delta C_t$ method [21]. Twentyone genes, divided into 5 categories were tested: 1) BMP Signaling: Bone Morphogenetic Protein 2 (Bmp2 – NM_017178.1), Bone Morphogenetic Protein 4 (Bmp4 – NM_012827.2), Runt related transcription factor 2 (Runx2 – NM_053470.2), Noggin (Noggin NM_012990.1), Chordin (Chordin - NM_057134.1); 2) Wnt Signaling: Wingless-related MMTV integration site 5A (Wnt5a – NM_022631.1), Wingless-related MMTV integration site

10B (Wnt10b – NM_01108111.1), Lymphoid enhancer binding factor 1 (Lef-1 – NM_NM_130429.1), Sclerostin (Sclerostin - NM_030584.1), Dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor (Dkk1 – NM_001106350.1); 3) Osteogenesis Markers: Collagen type 1 alpha (Col1a – NM_053304.1), Osteocalcin (Oc – NM_013414.1), Alkaline Phosphatase (Alpl – NM_013059.1), Osteoprotegerin (Opg – NM_U94330.1); 4) Inflammatory Cytokines and Apoptosis: Interleukin 1 β (IL-1 β – NM_031512.2), Interleukin 6 (IL-6 – NM_012589.1), Tumor Necrosis Factor alpha (Tnf-1 α – NM_012675.3), Caspase 3 (Cas-3 – NM_012922.2); 5) Growth Factors: Platelet-derived growth factor (Pdgf – NM_031524.1), Transforming growth factor beta 1 (Tgf- β 1 – NM_021578.2) and Vascular endothelial growth factor (Vegf – NM_001110333.1). Gene expression levels were normalized to the housekeeping gene β -actin (NM_031144.2). At each time point (3 days, 7 days, and 14 days after surgery) values for each gene in the Piezo group were calculated as relative expression compared to the Drill group. Statistical analysis was performed using Student's t-test and significant difference between the groups was defined by p values < 0.05.

Results

Histological and histomorphometrical analysis

All subcritical bone defects in both groups healed with full regeneration of bone. The histological and histomorphometrical characteristics of the healing stages were very similar between the groups (Figures 2 and 3 respectively). Three days post surgery, the bone defects created by either drilling or piezosurgery showed regular shapes and well defined edges. In both cases, blood clot and inflammatory cells occupied the whole area of the defect and no bone neoformation was observed at this time. By day 7, the blood clot was progressively replaced by a connective tissue exhibiting a high cell density. Osteoid tissue was also present within the defect and bone neoformation was not statistically significant between the two groups at this time point. At 14 days post surgery the defects of both groups were mainly filled by newly formed woven bone with thin and irregular trabeculae surrounded by fibro-vascular tissue. At 30 days post surgery the piezosurgery osteotomies and drilling osteotomies were completely bridged by mineralized bone with irregular shape and volume. At this point, the amount of bone was significantly higher in the piezo group (p < 0.05, 73.88% \pm 12.08 versus 57.81% \pm 12.00). However, this difference disappeared at 60 days after surgery, when a mature strip of lamellar bone reconstituted completely the entire cortical thickness of the tibiae in both groups with no differences in terms of quantity and quality.

Immunohistochemistry

The expression of VEGF and CAS-3, two early stage markers of bone healing [22,23], was similar between

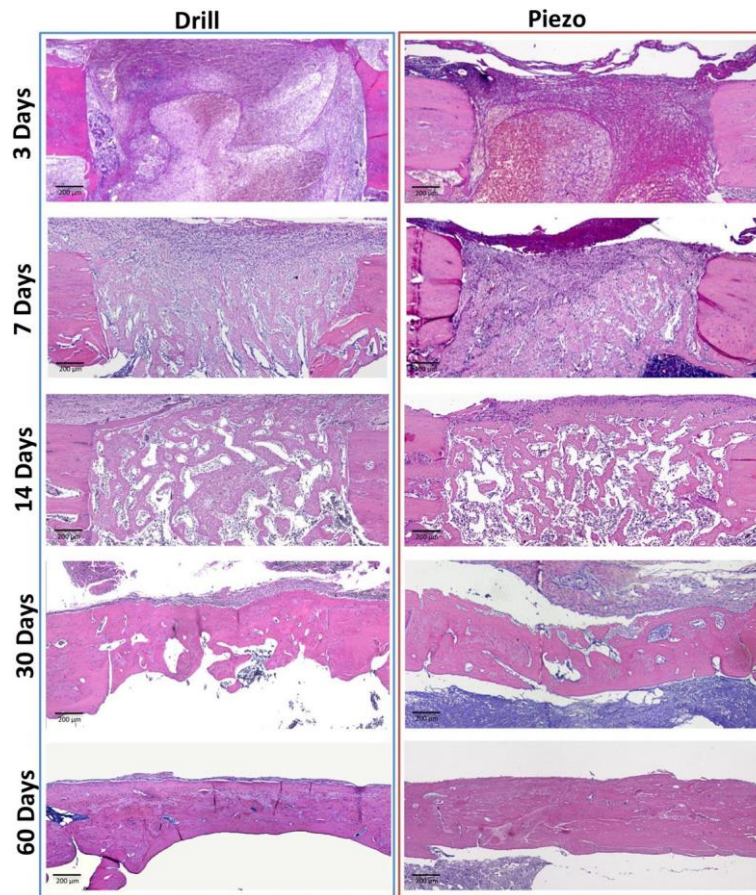


Figure 2 Histological evaluation of the healing process over time. Light micrographs obtained at 3, 7, 14, 30, and 60 days after surgery. Healing process after drilling (Drill group, left) and after piezosurgery (Piezo group, right). Hematoxylin and eosin staining.

the Drill and Piezo groups at 3, 7, and 14 days after surgery (Figures 4 and 5). The expression of OPG, RANKL and OC, three late stage markers of bone healing, was analyzed at 7 and 14 days after surgery (Figures 5 and 6). At both time points, no significant differences were detected for each gene between the two groups.

Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR analysis was performed at 3, 7, and 14 days after surgery (Figures 7, 8, and 9 respectively) to evaluate expression of genes of the BMP and Wnt pathways and expression of genes that mark osteogenesis, inflammation, and apoptosis. Gene expression analysis of growth factors such Pdgf, Tgf- β 1, and Vegf, which have also been shown to be involved with the bone healing process was also performed.

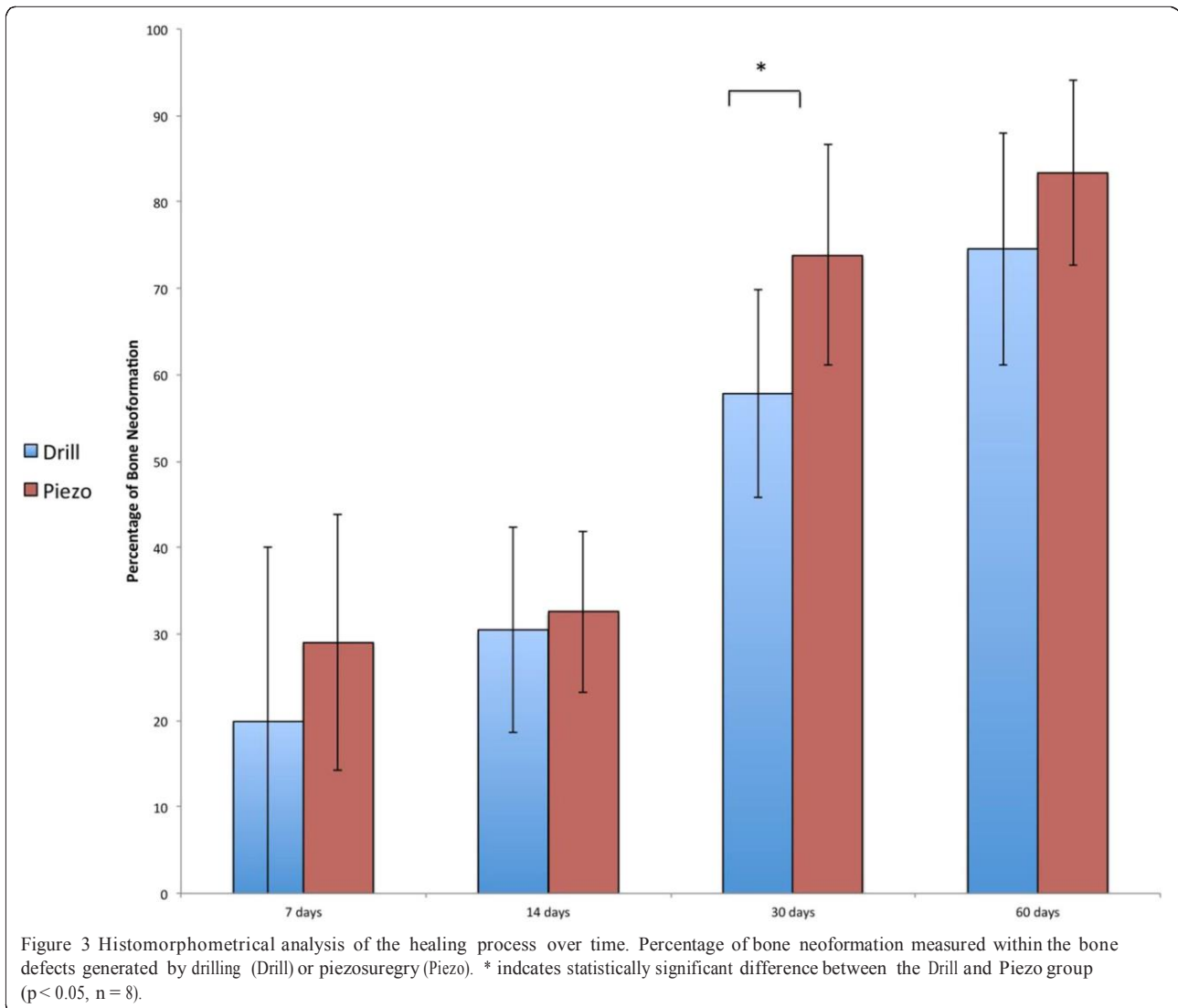
At three days after surgery (Figure 7), during the initial inflammatory phase of healing when the bone defects are filled by inflammatory tissue (see Figure 2), the pattern of genetic expression was similar between the Drill and the Piezo group, with no statistically significant differences between the two groups for all the genes tested.

By 7 days (Figure 8), when bone formation is actively occurring and part of the defect is filled by newly regenerated bone (see Figure 2), Runx2 (BMP signaling), Wnt10b and Sclerostin (Wnt signaling), and Cas-3 (apoptosis) were differentially expressed, with no detectable levels of expression or statistically significant lower levels of expression in the Piezo group versus the Drill group ($p < 0.05$).

At 14 days (Figure 9), when the bone defects are filled with bone and highly vascularized fibro-fatty bone marrow (see Figure 2), Wnt10b (BMP signaling) and IL-6 (inflammation) were differentially expressed, with no detectable levels of expression in the Piezo group.

Discussion

The aim of this study was to evaluate the dynamics of bone healing after piezosurgical and drilling osteotomy. Our study hypothesized that when compared to conventional drilling, bone healing after piezosurgery is faster due to enhanced expression of proteins involved in bone regeneration and reduced expression of proteins involved in inflammation and apoptosis.



To test our hypothesis we chose to study the bone healing process of a subcritical bone osteotomy since subcritical bone defects spontaneously and consistently heal by complete regeneration of the missing bone as their bone regenerative potentials are always fully exploited [24]. The only variables that can influence their healing process are the level of inflammation that occurs immediately after the creation of the defect and the speed by which the regeneration process may occur. By means of this strategy, in a rat model of tibial subcritical size bone defect we therefore were able to follow and compare the events associated with the regeneration of bone defects created by drilling (Drill group) or piezosurgery (Piezo group).

We analyzed the bone formation by means of histology and histomorphometry at several time points, going from the early inflammatory stage (3 days after

surgery) to the latest time point when complete bone regeneration and remodeling has occurred (60 days after surgery). By means of immunohistochemistry we also analyzed protein expression of early bone healing markers such as VEGF and CAS-3 at the early stages of the regenerative process (starting from day 3 up to day 14) and protein expression of bone remodeling markers such as OPG, RANKL, and OC at 7 and 14 days, when maximal regenerative activity occurs. Gene expression analysis of 21 genes expressing osteoblast differentiation regulators, osteogenic markers, inflammatory cytokines, and apoptotic factors was performed at 3, 7, and 14 days after surgery to validate and substantiate the immunohistochemical analysis. Among the osteoblast differentiation regulators, we tested several genes representative of the BMP canonical pathway [23] and of the Wnt canonical and non-canonical pathways [24] because of

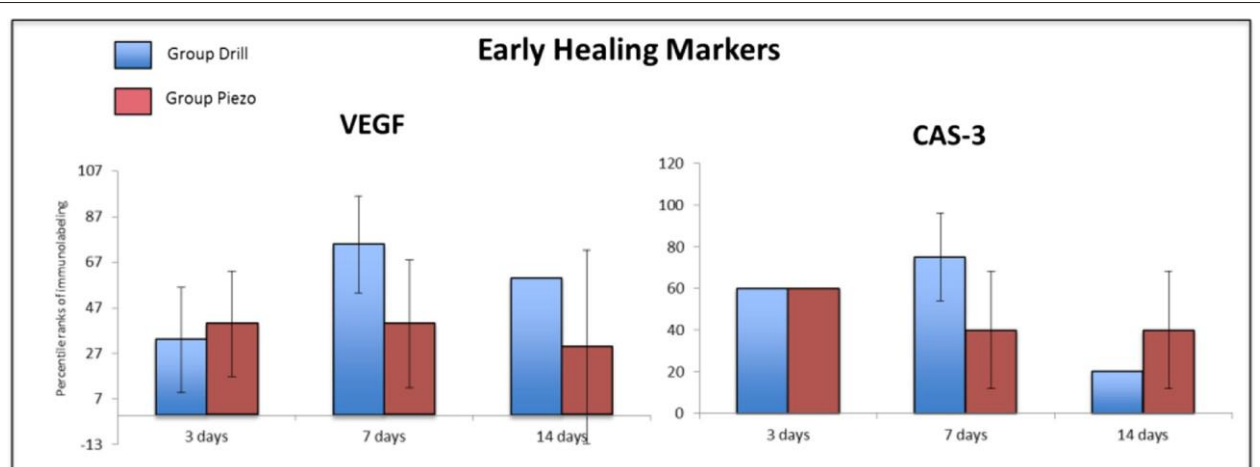


Figure 4 Immunohistochemical analysis of early healing markers during the bone regeneration process. Percentile ranks of immunolabeling for Vascular endothelial growth factor (VEGF) and Caspase-3 (CAS-3) at 3, 7, and 14 days after surgery, in bone defects generated by drilling (Drill) or piezosurgery (Piezo). No statistically significant differences were found across all time points (n = 3).

their relevance with the cellular activity that occurs during bone regeneration. Not all genes tested were consistently expressed throughout the healing process. We chose to utilize and show data regarding those genes that consistently presented with reproducible results.

The data collected showed that in our animal model the bone healing dynamics after piezosurgery are comparable to those observed with conventional drilling, with no evident signs of bone healing acceleration in the Piezo group versus the Drill group. At all the time points analyzed, histological analysis showed no differences between the defects created by piezosurgery and drilling. Histomorphometrical analysis also showed no differences, with the exception of higher levels of newly regenerated bone at 30 days after piezosurgery. However, this difference disappeared at 60 days, when the amount of newly regenerated bone was equal for both groups. This result could be indicative of a better ability to regenerate bone of the Piezo group at 30 days of healing. However, our subsequent analyses indicate that this temporarily higher amount of bone formation is not due to healing acceleration during the early stages of healing. In fact, immunohistochemical analysis at 3 days after surgery showed no statistically significant difference in terms of expression of both VEGF and CAS-3 and gene expression analysis of 21 different genes, including Vegf and Cas-3, showed no significant differences for all the genes analyzed. Also, seven days after surgery, immunohistochemistry showed no differences in expression of VEGF, CAS-3, OPG, RANKL, and OC, indicating no changes during early healing in terms of vascularization, apoptosis, and bone regeneration and remodeling. The gene expression analysis at 7 days also showed no

difference in expression of Vegf, Cas-3, Opg, and Oc. However, a significant reduction in expression of Runx2, Wnt10b, and Sclerostin was detected in the Piezo group at this time point. Since activation of BMP and Wnt signaling have been demonstrated to be essential at the early stages of bone repair [25,26], this data may indicate a reduction in terms of number of osteoprogenitor cells (reduction of Runx2) as well as a lower level of Wnt activity (lack of detection of Wnt10b indicating a direct down-regulation of the canonical Wnt pathway and reduction of expression of Sclerostin indicating the unnecessary expression of an inhibitor because of the already occurred down-regulation of the pathway) that may be interpreted as a deceleration rather than an acceleration of the healing process in the Piezo group. Furthermore, at 14 days after surgery, the immunoreaction also showed no significant differences between the two groups and gene expression analysis also showed no differences in expression of Vegf, Cas-3, Opg, and Oc. However, a significant reduction (lack of detection) of expression of Wnt10b and IL-6 in the Piezo group was detected at this time point. Thus, data collected at each time point may be indicative of a deceleration rather than acceleration of the healing process associated to piezosurgery.

It could be speculated, however, that the decreased levels of expression of Runx2 and Wnt10b seen at 7 and 14 days in the Piezo group are indicative of a diminished need for a full-speed regenerative process at these time points because in this group healing has already progressed to later and more advanced stages. However, considering that the histomorphometrical and immunohistochemical analyses did not show any difference in

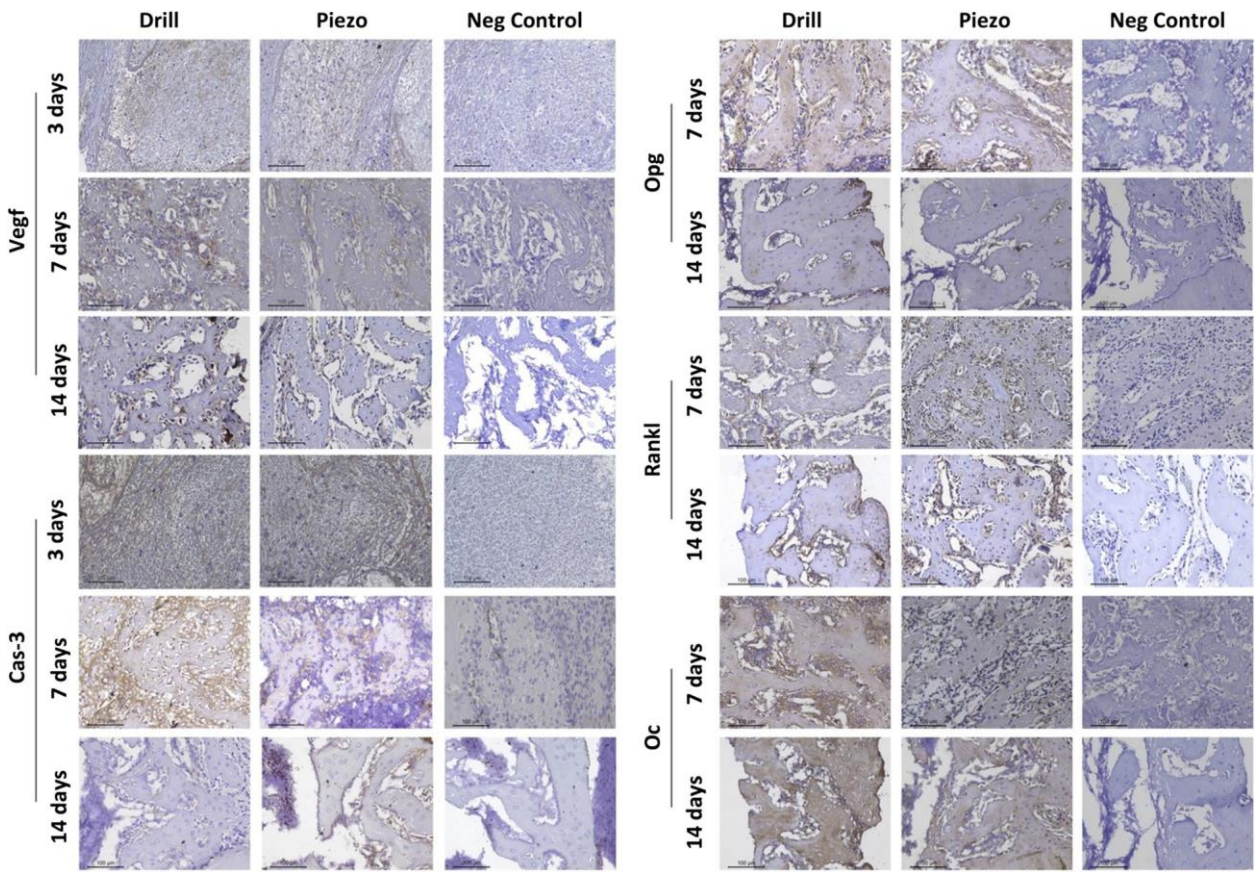


Figure 5 Immunolabeling of early healing and bone remodeling markers. Left: Immunolabeling of Vascular endothelial growth factor (VEGF) and Caspase-3 (CAS-3) of tissue sections obtained at 3, 7, and 14 days after drilling (Drill) or piezosurgery (Piezo). Right: Immunolabeling of Osteoprotegerin (OPG), Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), and Osteocalcin(OC) of tissue sections obtained at 7 and 14 days after drilling (Drill) or piezosurgery (Piezo). Sections were stained with the chromogen substrate diaminobenzidine and counterstained with hematoxylin. Staining scores were categorized as negative, positive (brown-yellow color), superpositive (brown color), and hyperpositive (intense brown color) (see Methods). Left (VEGF and CAS-3): at 3 days, only a few positive regions in brown-yellow color are observed in both groups. Hyperpositive immunolabeling (intense brown color) is visible only at 7 days. At 14 days, the expression of VEGF and CAS-3 tended to be positive (brown-yellow) and superpositive (brown color). Right (OPG, RANKL and OC): at 7 days, hyperpositive immunostaining (intense brown color) is observed for OPG and OC, whereas superpositive immunoreaction (brown color) was detected for RANKL. At 14 days postsurgery, superpositive labeling (brown color) is observed for all three markers. In the negative controls no immunopositivity was detected at all times.

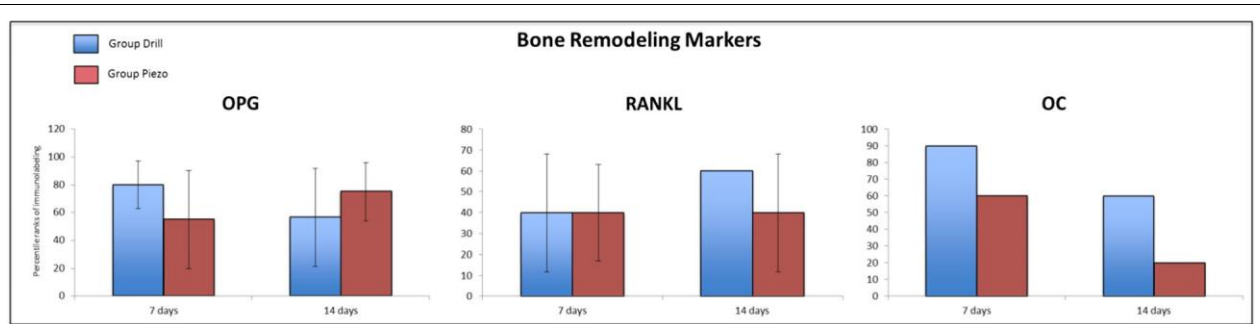


Figure 6 Immunohistochemical analysis of bone remodeling markers during the bone regeneration process. Percentile ranks of immunolabeling for Osteoprotegerin (OPG), Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), and Osteocalcin(OC) at 7 and 14 days after surgery, in bone defects generated by drilling (Drill) or piezosurgery (Piezo). No statistically significant differences were found across all time points (n = 3).

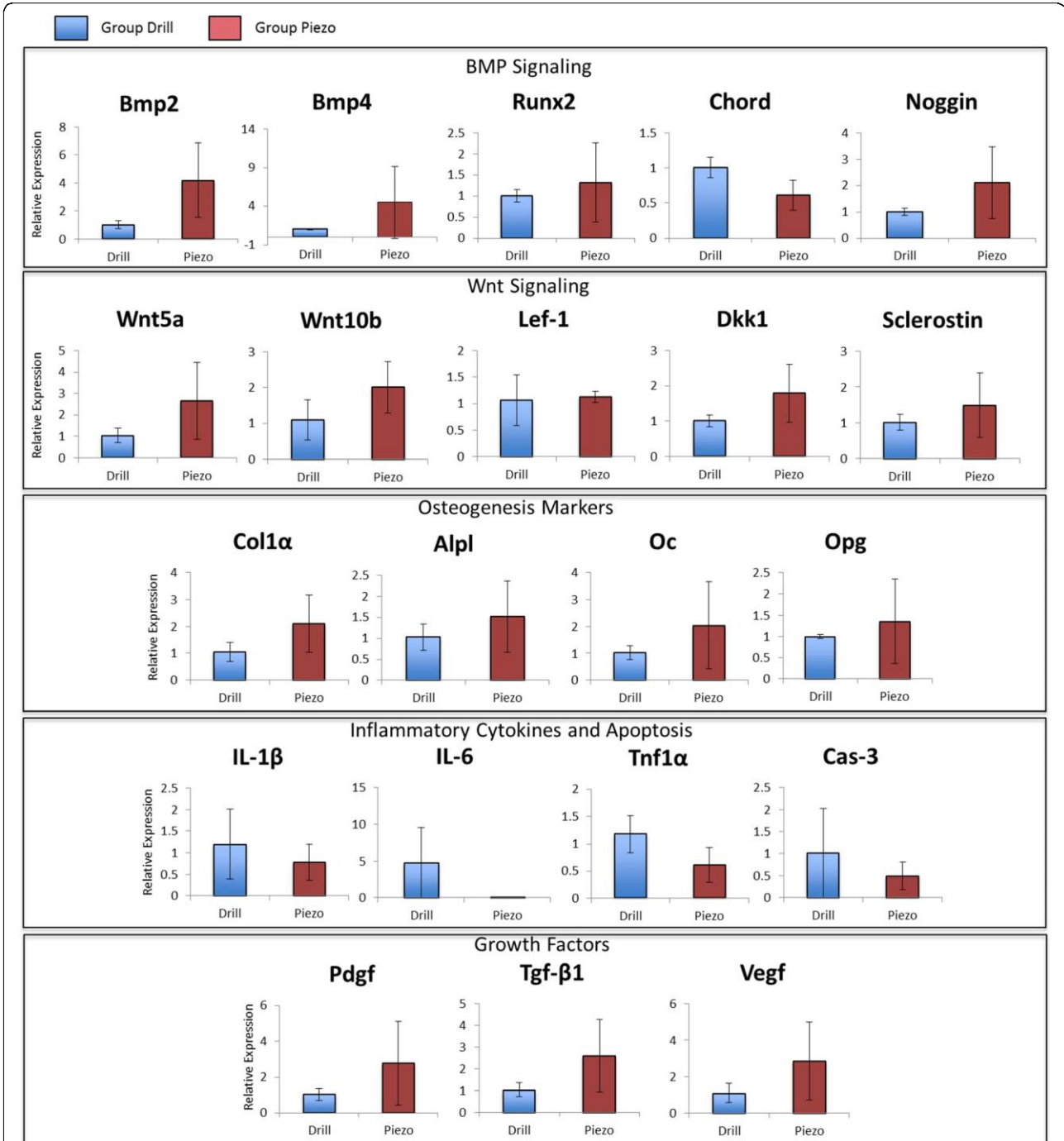
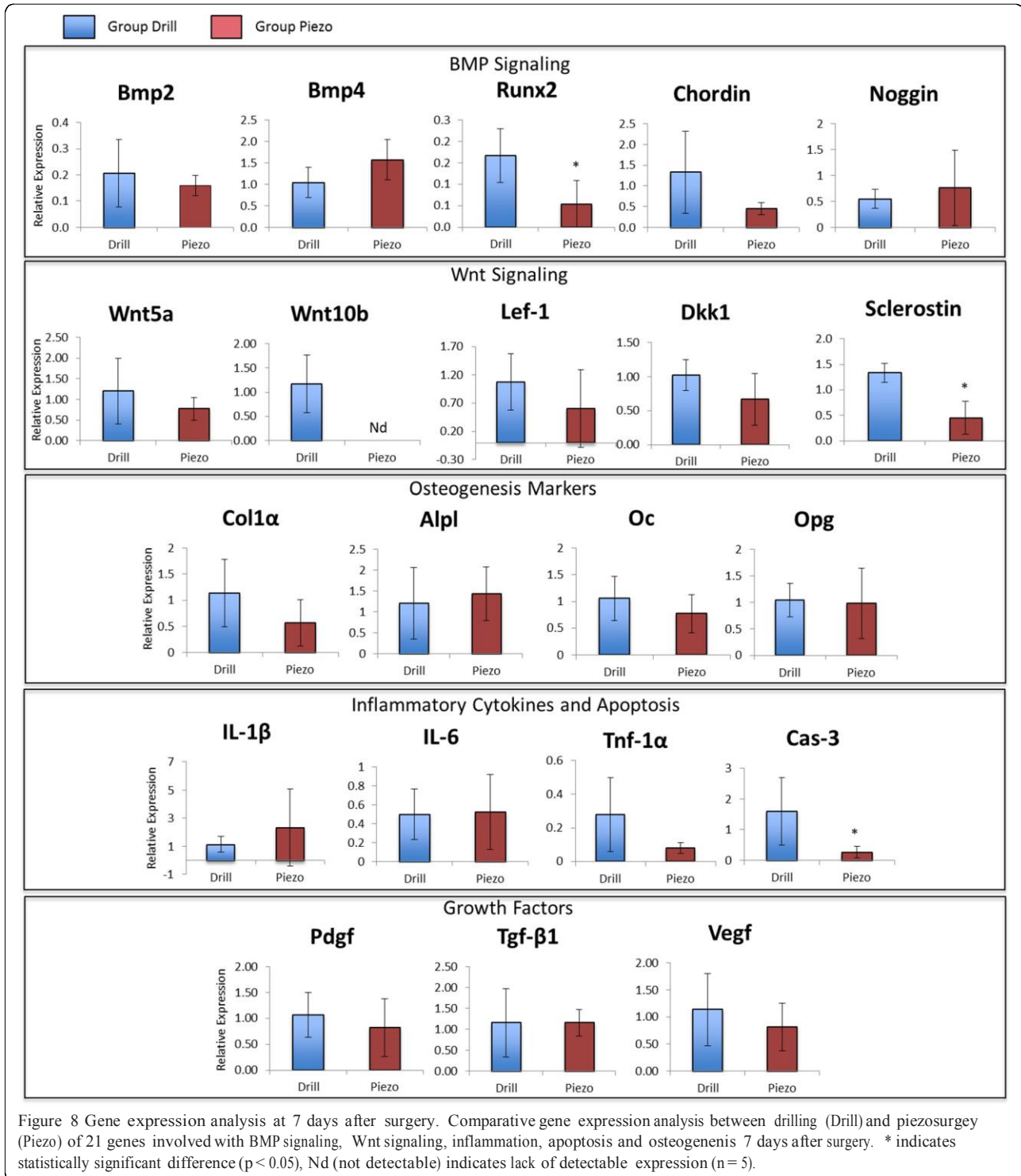


Figure 7 Gene expression analysis at 3 days after surgery. Comparative gene expression analysis between drilling (Drill) and piezosurgery (Piezo) of 21 genes involved with BMP signaling, Wnt signaling, inflammation, apoptosis and osteogenesis 3 days after surgery. * indicates statistically significant difference ($p < 0.05$), Nd (not detectable) indicates lack of detectable expression ($n = 5$).

terms of amount and quality of bone regeneration at all early time points tested, we believe that this is not necessarily the case and that the gene expression changes observed in the Piezo group may simply represent normal variability of a complex process that is not regulated by few genes only.

Our data is not in contrast with the results shown by previous studies that compared piezosurgery with other traditional osteotomy methods. For instance, a study by Ma et al. [17] found no statistically significant differences in terms of histomorphometry but higher degree of formation of vascularized tissues, of provisional



matrix, and of bone remodeling activity at 7 and 14 days after piezosurgery. These results may appear different from those shown in the present study. However, the animal model utilized by Ma and coworkers used bone defects smaller than those used in the present study and therefore the difference between the two studies may be

due to the size of the bone defects utilized. Preti and co-workers [18] concluded that piezoelectric surgery appears to be more efficient in the first phases of bone healing than traditional osteotomy. Once again, these results may appear in contrast to those presented in this work. However, in their study Preti and co-workers

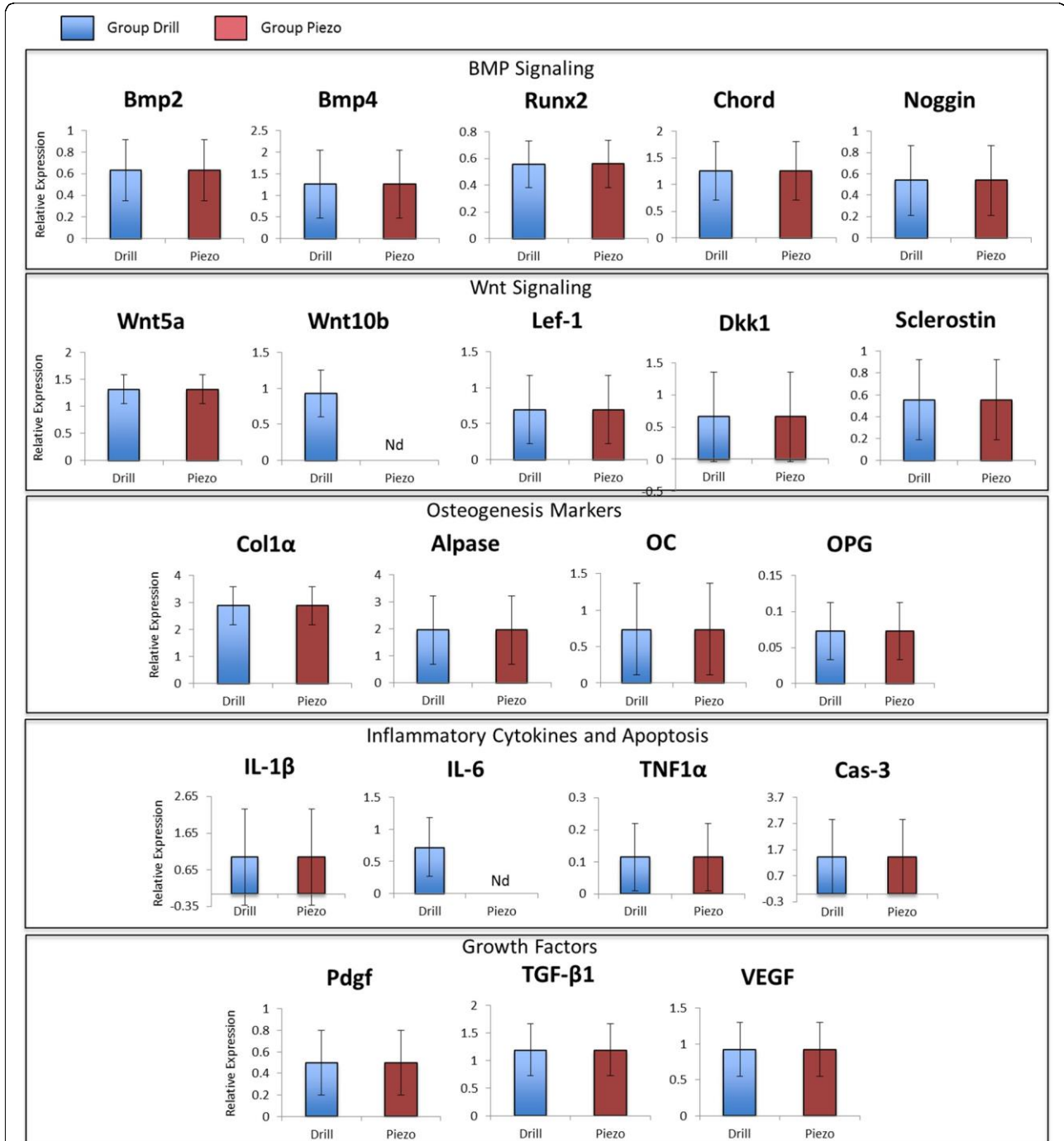


Figure 9 Gene expression analysis at 14 days after surgery. Comparative gene expression analysis between drilling (Drill) and piezosurgery (Piezo) of 21 genes involved with BMP signaling, Wnt signaling, inflammation, apoptosis and osteogenesis 14 days after surgery. * indicates statistically significant difference ($p < 0.05$), Nd (not detectable) indicates lack of detectable expression ($n = 5$).

analyzed the effects of piezosurgery on osseointegration of implants and not on regeneration of bigger bone defects. It is possible that the different conclusions are due to the different microenvironments studied. Similar consideration may be made between the bone defect microenvironment analyzed in our study and the

periodontal defect microenvironment analyzed by Vercellotti et al. [16]. Thus, it remains possible that piezosurgery accelerates osseointegration of titanium implants and facilitates periodontal regeneration without being advantageous in terms of regeneration of bigger bone defects.

Conclusions

Based on the results of our study we conclude that in a rat tibial subcritical bone defect model the bone healing dynamics after piezosurgery are comparable to those observed with conventional drilling. Further studies may be needed to analyze whether these two methods are comparable in terms of the healing dynamics of bone defects created in humans. However, piezosurgery remains a valuable alternative to the traditional rotating instruments thanks to its ease of use and bone cutting selectivity.

Competing interests

All authors declare: no support from any commercial organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

Authors' contributions

JCE: Methods and experiments design, laboratory work, data collection and interpretation, manuscript writing; EMJr: Methods and experiments designs, results interpretation, supervision of the experimental work; APSF: Methods and experiments design (immunohistochemistry), laboratory experiments (immunohistochemistry), results interpretation, manuscript writing; FRGR: Methods design and samples processing (quantitative RT-PCR analysis), laboratory experiments (quantitative RT-PCR analysis); RAM: Methods and experiments designs, results interpretation, supervision of the experimental work; KW: Methods design and samples processing (quantitative RT-PCR analysis), laboratory experiments (quantitative RT-PCR analysis); GI: Conceptualization of the experiment, supervision of the experimental work, manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported in part by a grant from the US National Institute of Health provided to G.I. (National Institute of Dental and Craniofacial research, grant# DE021069) and by a grant from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2010/07712-8, 2010/16645-2, 2012/16764-7).

Author details

¹Department of Diagnostic and Surgery, Araraquara Dental School, Univ Estadual Paulista – UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil.

²Department of Diagnosis and Surgery - Periodontics, UNESP - Univ Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Araraquara, SP, Brazil.

³Implantology Post Graduation Course, University Center of Araraquara–UNIARA, Araraquara, São Paulo, Brazil. ⁴Department of Oral Medicine, Infection, and Immunity, Harvard School of Dental Medicine – Harvard University, 188 Longwood Avenue, Boston, MA 02115 – REB 403, USA. ⁵Harvard Stem Cell Institute, Cambridge, MA, USA.

Received: 4 August 2013 Accepted: 10 September 2013

Published: 23 September 2013

References

- Chacon GE, Bower DL, Larsen PE, McGlumphy EA, Beck FM: Heat production by 3 implant drill systems after repeated drilling and sterilization. *J Oral Maxillofac Surg* 2006, **64**:265–269.
- Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, Margonar R, Pereira-Filho VA, Garcia IR Jr, Vieira EH: Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. *J Oral Maxillofac Surg* 2008, **66**:1233–1240.

- Eggers G, Klein J, Blank J, Hassfeld S: Piezosurgery: an ultrasound device for cutting bone and its use and limitations in maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2004, **42**:451–453.
- Leclercq P, Zenati C, Amr S, Dohan DM: Ultrasonic bone cut part 1: State-of-the-art technologies and common applications. *J Oral Maxillofac Surg* 2008, **66**:177–182.
- Schlee M, Steigmann M, Bratu E, Garg AK: Piezosurgery: basics and possibilities. *Implant Dent* 2006, **15**:334–340.
- Barone A, Santini S, Marconcini S, Giacomelli L, Gherlone E, Covani U: Osteotomy and membrane elevation during the maxillary sinus augmentation procedure. A comparative study: piezoelectric device vs. conventional rotative instruments. *Clin Oral Implants Res* 2008, **19**:511–515.
- Happe A: Use of a piezoelectric surgical device to harvest bone grafts from the mandibular ramus: report of 40 cases. *Int J Periodontics Restor Dent* 2007, **27**:241–249.
- Danza M, Guidi R, Carinci F: Comparison between implants inserted into piezo split and unsplit alveolar crests. *J Oral Maxillofac Surg* 2009, **67**:2460–2465.
- Bovi M, Manni A, Mavriqi L, Bianco G, Celletti R: The use of piezosurgery to mobilize the mandibular alveolar nerve followed immediately by implant insertion: a case series evaluating neurosensory disturbance. *Int J Periodontics Restor Dent* 2010, **30**:73–81.
- Landes CA, Stubinger S, Rieger J, Williger B, Ha TK, Sader R: Critical evaluation of piezoelectric osteotomy in orthognathic surgery: operative technique, blood loss, time requirement, nerve and vessel integrity. *J Oral Maxillofac Surg* 2008, **66**:657–674.
- Kramer FJ, Ludwig HC, Materna T, Gruber R, Merten HA, Schliephake H: Piezoelectric osteotomies in craniofacial procedures: a series of 15 pediatric patients. Technical note. *J Neurosurg* 2006, **104**:68–71.
- Claire S, Lea SC, Walmsley AD: Characterisation of bone following ultrasonic cutting. *Clin Oral Investig* 2013, **17**:905–912.
- Sortino F, Pedulla E, Masoli V: The piezoelectric and rotatory osteotomy technique in impacted third molar surgery: comparison of postoperative recovery. *J Oral Maxillofac Surg* 2008, **66**:2444–2448.
- Maurer P, Kriwalsky MS, Block Veras R, Vogel J, Syrowatka F, Heiss C: Micromorphometrical analysis of conventional osteotomy techniques and ultrasonic osteotomy at the rabbit skull. *Clin Oral Implants Res* 2008, **19**:570–575.
- Horton JE, Tarpley TM Jr, Wood LD: The healing of surgical defects in alveolar bone produced with ultrasonic instrumentation, chisel, and rotary bur. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1975, **39**:536–546.
- Vercellotti T, Nevins ML, Kim DM, Nevins M, Wada K, Schenk RK, Fiorellini JP: Osseous response following resective therapy with piezosurgery. *Int J Periodontics Restor Dent* 2005, **25**:543–549.
- Ma L, Stubinger S, Liu XL, Schneider UA, Lang NP: Healing of osteotomy sites applying either piezosurgery or two conventional saw blades: a pilot study in rabbits. *Int Orthop* 2013, **37**(8):1597–1603.
- Prete G, Martinasso G, Peirone B, Navone R, Manzella C, Muzio G, Russo C, Canuto RA, Schierano G: Cytokines and growth factors involved in the osseointegration of oral titanium implants positioned using piezoelectric bone surgery versus a drill technique: a pilot study in minipigs. *J Periodontol* 2007, **78**:716–722.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth* 2012, **9**:671–675.
- dos Santos PL, Queiroz TP, Margonar R, Gomes de Souza Carvalho AC, Okamoto R, de Souza Faloni AP, Garcia IR Jr: Guided implant surgery: what is the influence of this new technique on bone cell viability? *J Oral Maxillofac Surg* 2013, **71**:505–512.
- Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001, **25**:402–408.
- Miura M, Chen XD, Allen MR, Bi Y, Gronthos S, Seo BM, Lakhani S, Flavell RA, Feng XH, Robey PG, et al: A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2004, **114**:1704–1713.
- Chim SM, Tickner J, Chow ST, Kuek V, Guo B, Zhang G, Rosen V, Erber W, Xu J: Angiogenic factors in bone local environment. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013, **24**:297–310.

24. Hollinger JO, Kleinschmidt JC: The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990, 1:60–68.
25. Lowery JW, Pazin D, In'ini G, Kokabu S, Chappuis V, Capelo LP, Rosen V: The role of BMP2 signaling in the skeleton. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2011, 21:177–185.
26. Baron R, Kneissel M: WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 2013, 19:179–192.

doi:10.1186/1479-5876-11-221

Cite this article as: Esteves et al.: Dynamics of bone healing after osteotomy with piezosurgery or conventional drilling – histomorphometrical, immunohistochemical, and molecular analysis. *Journal of Translational Medicine* 2013 11:221.

Estudo 2

Artigo2

Efeitos da osteotomia com Brocas versus Osteotomia com LASER Er,Cr:YSGG no processo de reparo ósseo – estudo histomorfométrico e imuno-histoquímico.*

Autores:

Jônatas Caldeira Esteves*

Ana Paula de Souza Faloni**

Paula Delello Macedo*

Patrícia Borges Nakata*

Rosemary Adriana Chierici Marcantonio*

Elcio Marcantonio-Junior*

*UNESP- Univ. Estadual Paulista, School of Dentistry, Department of Diagnosis and Surgery, Division of Periodontology, Rua Humaitá, 1680, 14801-903 Araraquara –SP/Brazil

** UNIARA – Centro Universitário de Araraquara, Department of Health Sciences – Dental School, Avenida Maria Antônia Camargo de Oliveira, 179, Bairro Visa Suconasa, Araraquara-SP, CEP 14807-120.

Correspondence

Jônatas Caldeira Esteves

jonaatsce@hotmail.com

Add. Rua Humaitá n. 1680

Department of Diagnosis and Surgery - UNESP

*Artigo normalizado segundo diretrizes do periódico Journal of Periodontology

Resumo

Introdução: O LASER Er,Cr:YSGG tem sido empregado na clínica odontológica, no entanto poucos estudos tem demonstrado as reais vantagens sob o ponto de vista de reparo quando do emprego deste dispositivo para osteotomias. O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar o processo de reparo de defeitos ósseos produzidos por LASER Er,Cr:YSGG e brocas convencionais por meio de análises histomorfométrica e imuno-histoquímica.

Métodos: 98 ratos foram divididos em dois grupos com 48 animais animais: Grupo Broca e Laser. Após exposição cirúrgica da tibia direita, os animais foram submetidos a uma osteotomia de 2mm de diâmetro preparadas brocas convencionais, no grupo Broca e por LASER Er,Cr:YSGG no Grupo Laser. Os animais foram sacrificados aos 0, 3, 7, 14, 30 e 60 dias pós-operatórios e os espécimes foram preparados para obtenção de cortes histológicos usados para análise histomorfométrica e imuno-histoquímica para detecção de Osteocalcina, Osteoprotegerina, Rankl, Vegf e Caspase-3.

Resultados: A osteotomia com broca produziu cortes regulares com paredes lisas, ao passo que as osteotomias no Grupo Laser eram irregulares e apresentavam uma faixa de carbonização e necrose óssea que era lentamente reabsorvida ao longo do processo de reparo. Apesar destas características, o reparo ósseo no grupo laser foi mais acelerado nos períodos iniciais sendo detectada expressão aumentada de Vegf e Osteocalcina. Os defeitos em ambos os grupos foram completamente reparados por osso neoformado.

Conclusão: Apesar de produzir injúrias térmicas ao tecido ósseo, o processo de reparo de osteotomias preparas por LASER Er,Cr:YSGG é comparável ao de brocas convencionais.

Palavras-chave: LASER Er,Cr:YSGG (*Er,Cr:YSGG laser*), Osteotomia (*Osteotomy*), Brocas (*Drill*), Reparo Ósseo (*Bone Healing*).

Introdução

A demanda por osteotomias menos traumáticas que garantam a viabilidade do tecido ósseo em um processo de reparo previsível tem estimulado o aprimoramento dos sistemas de osteotomia, tornando-os ferramentas altamente precisas e de uso fundamental nos campos da neurocirurgia, otorrinolaringologia, ortopedia e cirurgia Buco-maxilo-facial. Especificamente na implantodontia, o desenho do leito cirúrgico onde o implante será inserido e a vitalidade do osso nas margens do preparo são requisitos fundamentais para a osseointegração do implante^{1,2}. O processo de reparo ósseo, por sua vez, depende de eventos celulares que são mediados por proteínas da matriz óssea e fatores de crescimento, como o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (Vegf), responsável pela angiogênese³, a Osteocalcina (Oc), expressa por osteoblastos e responsável pela conexão da hidroxiapatita à matriz óssea⁴, bem como proteínas relacionadas à remodelação óssea, como a Osteoprotegerina (Opg) e o Receptor Ativador de Fator Nuclear Kapp-B (Rankl) que respectivamente, previnem ou estimulam a formação de osteoclastos⁵. A Caspase-3 é um marcador irreversível do processo de apoptose e pode sinalizar a morte celular por diversos fatores como lesão tecidual⁶. No tecido ósseo, a apoptose de osteócitos tem demonstrado relação direta com a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea⁷.

No início da década de 1960, os LASERS de alta intensidade passaram a ser utilizados em medicina, em cirurgias de tecidos moles. Com o aprimoramento da tecnologia e surgimento dos LASERS de CO₂ (Dióxido de Carbono) e de Nd:YAG (Neodímio: Ítrio-Alumínio-Granada), a cirurgia a LASER foi largamente expandida, no entanto, o emprego destes sistemas em tecidos mineralizados era limitado pela ausência de pigmentos que absorvessem a radiação LASER no osso e na dentina e também pela carbonização e derretimento da matriz mineralizada produzidos durante a irradiação^{8,9}. Foi no início da década de 1990, com surgimento dos LASERS da família Érbio: Er:YAG (Acrônimo em

Inglês para Érbio: Ítrio-Alumínio-Granada) e Er,Cr:YSGG (Acrônimo em inglês para Érbio, Cromo:Ítrio-Escândio-Gálio-Granada) que as osteotomias a LASER ganharam espaço na medicina e odontologia⁸. Ambos os LASERS têm sua radiação absorvida por moléculas de água e hidroxiapatita agindo de forma muito semelhante sobre os tecidos moles e mineralizados¹⁰⁻¹², no entanto, o LASER Er,Cr:YSGG, desenvolvido mais recentemente, possui um comprimento de onda de 2,78 μ m que coincide com o pico de absorção de energia pelas moléculas de água e componentes hidratados do tecido. Sugere-se que o mecanismo de corte pelo LASER ocorre pela absorção da energia luminosa pelos componentes hidratados resultando em uma explosão violenta, porém controlada da estrutura onde a molécula está inserida. A força hidrocínética da explosão produz a separação mecânica do tecido mineralizado^{13,14}.

O LASER Er,Cr:YSGG é um LASER infravermelho de luz pulsada (140 a 150 μ s) com potência que varia de 0 a 6 Watts, ajustável conforme o tecido a ser trabalhado. A luz produzida no aparelho percorre uma fibra ótica que a concentra em um cristal de safira de 600 μ m de diâmetro acoplado a uma peça de mão. O sistema de resfriamento é composto por um spray ajustável de ar e água que ajuda a prevenir o dano térmico excessivo¹¹.

Particularmente em osteotomias, Kimura et al.¹⁵ demonstraram cortes regulares com paredes lisas e afiadas e sem alteração da estrutura inorgânica do osso após osteotomias com LASER Er,Cr:YSGG em fragmentos ósseos de cães. Com relação ao aquecimento tecidual, os mesmo autores detectaram um aumento máximo de temperatura de 12,6°C na irradiação de um mesmo ponto durante 12 segundos, o que não ultrapassa o limiar de necrose óssea descrito por Eriksson, Albrektsson¹⁶, estimado em um aumento em 10°C durante durante 1 minuto. Wang et al.¹¹, em um estudo *in vivo* utilizando o mesmo equipamento, observaram faixas de necrose e carbonização entre 90 e 100 μ m, que no entanto, foram completamente reabsorvidas aos 14 dias e não impediram o processo de reparo ósseo.

O processo de osseointegração de implantes inseridos em leitos preparados por LASER foi experimentalmente avaliado por Salina et al.¹⁷, que também observaram áreas de carbonização nas osteotomias com LASER Er:YAG. Contudo, as regiões de osso carbonizado não impediram a osseointegração dos implantes e o reparo dos defeitos ósseos aos 30 dias. Estes dados foram posteriormente confirmados por Stübinger et al.¹⁸ que obtiveram valores de torque de remoção superiores após 8 semanas de cicatrização para implantes inseridos em leitos preparados por LASER Er:YAG em pélvis de ovelhas em comparação a leitos produzidos por brocas.

Um recente estudo desenvolvido por nosso grupo¹⁹ demonstrou superioridade em termos de neoformação óssea aos 30 dias no reparo de defeitos produzidos por LASER Er,Cr:YSGG e brocas convencionais. As faixas de carbonização e necrose presentes nas margens dos defeitos produzidos pelos LASER foram gradativamente reduzida ao longo dos períodos de reparo.

De acordo com os estudos da literatura, o LASER Er,Cr:YSGG tem demonstrado ser uma ferramenta promissora em cirurgias ósseas. No entanto, até o momento, não existem estudos que investiguem *in vivo* as características histomorfométricas do reparo, associado à expressão dos marcadores de remodelação óssea, angiogênese e apoptose, que podem indicar particularidades da dinâmica da cicatrização que ajudariam a compreender as reais vantagens da osteotomia a LASER diante dos sistemas rotatórios convencionais. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de reparo de defeitos produzidos por LASER Er,Cr:YSGG ou brocas convencionais por meio de análises morfológica, histomorfométrica e imuno-histoquímica.

Materiais e Métodos

Os Materiais e Métodos empregados neste estudo tiveram aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Processo CEEA/FOAr 15/2010 – Anexo A). Cento e quarenta e quatro ratos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Holtzman*), machos, adultos, de aproximadamente 3 meses de idade, com massa corporal média de 450 gramas, foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara (FOAr-UNESP) e alimentados com ração sólida e com acesso a água *ad libitum*, antes e durante todo o período experimental, em ambiente com luz, temperatura e higiene controladas, com gaiolas identificadas pelo nome do pesquisador responsável, massa corpórea do animal, data da cirurgia e do sacrifício, conforme o grupo e período, também apontados.

Os animais foram randomicamente divididos, por meio de sorteio, em 3 grupos de 48 animais cada, que foram avaliados em seis diferentes períodos experimentais – zero, 3, 7, 15, 30 e 60 dias com 8 animais em cada período.

Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com uma combinação de Cloridrato de Xilazina (Francotar, Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda., São Paulo, Brasil) na dosagem de 0,04ml/100g de massa corporal, para promover o relaxamento muscular; e na sequência, Cloridrato de Quetamina (Vyrbaxil, Virbac do Brasil Ind Com, Ltda, São Paulo, Brasil.) na proporção de 0,08 ml/100g de massa corporal.

Posteriormente, os animais foram submetidos à tricotomia da região ântero-lateral do membro posterior direito, seguida por anti-sepsia do campo cirúrgico com gaze esterilizada, embebida em solução de PVP-I 10% com 1% de iodo ativo, se então, posicionados em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica.

Com uma lâmina de bisturi número 15, montada em cabo número 3, foram realizadas duas incisões lineares de 3 centímetros de extensão no sentido longitudinal da face medial da tíbia, a primeira envolvendo o tecido cutâneo, e a segunda tecido muscular e periosteal. Em seguida, foi realizado o descolamento dermo-mio-periosteal do retalho com auxílio de um descolador de periósteo, e exposição da metáfise tibial para realização de uma osteotomia de 2 milímetros de diâmetro. Os defeitos foram criados com Brocas no Grupo Broca e LASER Er,Cr:YSGG no Grupo Laser como descrito a seguir:

Grupo I: Fresa de aço inoxidável cirúrgico (Conexão sistema de próteses, Arujá, São Paulo, Brasil) acoplada a um contra-ângulo redutor (20:1) (Peça Angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, Kavo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Alemanha), montado em um motor elétrico com bomba peristáltica (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil), com velocidade de 1200 rpm (rotações por minuto), sob irrigação externa com solução isotônica de cloreto de sódio 0,9% (Fisiológico, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil). A osteotomia foi realizada com uma sequência progressiva de fresas (fresa lança; fresa helicoidal de 2mm), na cortical externa da tíbia. As fresas foram trocadas a cada 10 perfurações para se evitar desgaste e sobreaquecimento ósseo.

Grupo II: Foi utilizado LASER de alta intensidade Er,Cr:YSGG (*Erbium-Cromium:Ytrium, Scandium, Gallium, Garnet* –com os seguintes parâmetros: 2,78µm de comprimento de onda, 20Hz de frequência, 150mJ de energia de pulso, 3W de potência, 50% de emissão de água/ar. Foi utilizada a ponta G4 (Waterlase®, Biolase, Estados Unidos) com 600µm de espessura e 6mm de comprimento, mantida perpendicular à região no modo de não contato (cerca de 2mm do tecido). O defeito ósseo foi previamente delimitado por meio de marcação circular correspondente ao diâmetro da osteotomia sendo posteriormente checado por meio de uma sonda periodontal milimetrada (Duflex, SSWhite, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro).

Para delimitar a região de osteotomia no momento da coleta das peças e da microtomia, dois cones de guta-percha foram inseridos em perfurações feitas por broca diamantada cônica número 1012 (KG Sorensen – Agerskov, Dinamarca) que distavam 2 milímetros da borda do defeito em sua porção mais central. O leito cirúrgico foi, em seguida, irrigado copiosamente e os tecidos suturados com fio nylon 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson Medical Limited, São José dos Campos, São Paulo, Brasil). Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo cirurgião previamente treinado. Após a cirurgia os animais receberam dose única de penicilina e estreptomicina 0.1ml/kg de peso corporal (Pentabiótico Pequeno Porte, Fort Dodges, Campinas, São Paulo, Brasil) e gavagem com paracetamol 15mg/kg de peso corporal (Paracetamol-Medley, Campinas, São Paulo, Brasil). Por meio de dose excessiva de anestésico, os animais foram submetidos à eutanásia, de acordo com os períodos de estudo: zero, 3, 7, 14, 30 e 60 dias.

Coleta das Amostras

Após o sacrifício dos animais, a tíbia direita foi removida com uma margem distando 2mm da marca de guta-percha e fixada em formaldeído a 4% (preparado a partir de paraformaldeído). Após um período de 48 horas de fixação, as peças foram imersas em solução de EDTA a 7% por 60 dias, para descalcificação; e em seguida, cortadas em micrótomo em cortes semi-seriados com 4µm de espessura longitudinalmente ao longo eixo da tíbia.

Análises Morfológica e Histomorfométrica

Inicialmente foi realizada a análise morfológica dos cortes obtidos, Nesta análise qualitativa foram avaliadas as características do defeito ósseo criado e do tecido ósseo

adjacente à osteotomia, bem como as características do processo de reparo ao longo dos períodos de estudo.

A análise histomorfométrica foi conduzida utilizando-se os dois cortes mais centrais do defeito em um microscópio de luz (Leica DM2500, Leica Microsystems, Wetzlar Hessen, Alemanha), com aumentos originais de 25 e 100x. Em seguida, imagens representativas foram obtidas por meio de uma câmera fotográfica digital DFC-300-FX (Leica Microsystems, Alemanha), com resolução de 1,3 megapixels, acoplada ao microscópio de luz. As imagens foram analisadas no Software Image J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EUA) para quantificar a neoformação óssea. As avaliações foram realizadas por um único examinador calibrado e cego para os grupos. As mensurações foram feitas em triplicata, em três momentos distintos, com intervalo de uma semana entre cada avaliação observando-se coerência entre as diferentes análises. A porcentagem de osso neoformado foi obtida como descrito a seguir: a área correspondente ao defeito ósseo foi delimitada e denominada Área Total (AT) tendo como base as marcações de guta-percha e as características morfológicas do osso original e neoformado. O valor da AT era atribuído em pixels. Área de neoformação óssea (ANFO) foi então delimitada no interior da AT e também expressa em pixels. A porcentagem de osso neoformado foi calculada como uma fração da AT de acordo com a seguinte fórmula: $(ANFO \times 100) / AT$. Os valores obtidos foram submetidos ao teste de aderência à Curva Normal e homogeneidade de variâncias. Uma vez constatada a normalidade da distribuição amostral, realizou-se o teste one-way ANOVA, seguido por pós teste de Tukey para comparações múltiplas em um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Análise Imuno-histoquímica

A análise Imuno-histoquímica foi realizada nas amostras coletadas no sacrifício imediato, 3, 7 e 14 dias pós-operatórios, em três espécimes aleatoriamente escolhidos, para detecção de proteínas ligadas ao processo da neoformação óssea: Osteocalcina (Oc); remodelação óssea: Osteoprotegerina (Opg) e Ligante do Ativador do Receptor do Fator Kappa-B Nuclear (Rankl); angiogênese: Fator de Crescimento Endotelial Vascular (Vegf); e de apoptose: Caspase-3. Cortes histológicos com 4µm de espessura foram aderidos a lâminas silanizadas (DAKO A/S, Golstrup, Dinamarca) seguindo-se a tramitação laboratorial de rotina para desparafinização e reidratação. A recuperação antigênica para detecção Oc, Opg e Rankl foi realizada por meio da incubação das lâminas em solução de tripsina 0.5% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) por 20 minutos a 37° C e resfriadas à temperatura ambiente. As lâminas selecionadas para marcação de Vegf e Caspase-3 foram imersas em solução de citrato de sódio 10mM em pH 6.0 a 70-75°C por 30 minutos em panela de pressão. Para o bloqueio da peroxidase endógena, todos os cortes foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio 3% (LabSynth, Diadema, Brasil) por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com solução de Albumina de Soro Bovino 3% (Bovine Serum Albumin-BSA) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) em temperatura ambiente para o bloqueio de ligações inespecíficas. Os cortes foram então incubados *overnight* com anticorpos primários específicos para Oc (Anticorpo Policlonal de Camundongo – Abcam, Inc. USA, catálogo ab13420, diluição 1:200), Opg (Anticorpo Policlonal de Coelho – Abcam, Inc. USA, catálogo ab73400, diluição 1:300), Rankl (Anticorpo Policlonal de Camundongo – Santa Cruz Biotechnology Inc., USA, catálogo sc-7628, diluição 1:200), Vegf (Anticorpo Policlonal de Coelho – Abcam, Inc. USA, catálogo ab46154, dilution 1:400) e Caspase-3 (Anticorpo Policlonal de Coelho – Abcam, Inc. USA, catálogo ab44976, diluição 1:400). Como controle negativo, os anticorpos primários foram omitidos em cortes específicos para cada anticorpo.

Após sucessivas lavagens, os cortes foram incubados com anticorpos secundários do (Universal LSAB 2 Kit/HRP Kit DAKO Inc., USA) segundo as instruções do fabricante e o produto da reação foi detectado pelo complexo Avidina-Biotina-Peroxidase e corado com o cromógeno diaminobenzidina (Liquid DAB+Substrate Chromogen System - DAKO, USA). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris e examinados por um examinador calibrado e cego para os grupos experimentais, utilizando os mesmo equipamentos da análise morfológica em aumentos de 25x a 100x. A quantificação da expressão das proteínas foi realizada por uma análise quantitativa ordinal seguindo metodologia previamente descrita^{20,21}. Brevemente: os escores foram categorizados como negativo (-), positivo (+), superpositivo (++) e hiperpositivo (+++). Para executar a comparação quantitativa os escores foram convertidos em percentis: 0% (equivalente ao escore negativo —); 20% (equivalente ao escore positivo —+” e 10 a 30 % de intensidade total de coloração), 60% (equivalente ao escore superpositivo —++” e 50 a 70 % de intensidade total de coloração) e 90% (equivalente ao escore hipersuperpositivo —+++” e 80 a 100 % de intensidade total de coloração). As médias dos percentis de cada proteína foram submetidas ao teste de aderência à Curva Normal e homogeneidade de variâncias. Como não foi constatada a normalidade da distribuição amostral, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas dos diferentes períodos em ambos os grupos, considerando-se o nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Resultados

Análise Histomorfométrica

As figuras 1 e 2 apresentam, respectivamente, fotomicrografias ilustrando o processo de reparo ao longo dos períodos estudados e a porcentagem de osso neoformado em cada um deles.

Sacrifício Imediato

Os cortes obtidos a partir dos espécimes do Grupo Broca exibiam um defeito ósseo com paredes regulares preenchidos pelo coágulo sanguíneo. Alguns debris ósseos resultantes da osteotomia, eram observados na porção periférica do defeito. De forma geral, as margens ósseas permaneciam íntegras embora algumas lacunas osteocíticas apresentavam-se vazias. No Grupo Laser, os defeitos ósseos eram irregulares e suas margens apresentavam uma linha basófila nas regiões sugestivas de carbonização, em todos os espécimes.

3 Dias

Aos três dias pós-operatórios o defeito, em ambos os grupos, apresentava-se preenchido pelo coágulo sanguíneo. Além disso, células inflamatórias, em sua grande maioria neutrófilos, também eram observadas. Neste período, o infiltrado inflamatório era mais intenso no Grupo Laser. O tecido de granulação desenvolvia-se sob o coágulo sanguíneo, especialmente junto das margens do defeito. No Grupo Broca, uma estreita faixa de osso necrótico podia ser observada na borda do defeito. Já no Grupo Laser a faixa basófila de carbonização era evidente e seguida por uma região de osso necrótico maior do que aquela observada nos espécimes do Grupo Broca.

7 dias

Nos Grupos Broca e Laser, o coágulo sanguíneo era progressivamente substituído por tecido conjuntivo aos 7 dias. Células inflamatórias distribuía-se nas margens do defeito, logo abaixo do coágulo sanguíneo, que ainda era observado na porção mais central e superficial do defeito. Perifericamente, às margens da osteotomia, pequenas áreas de matriz osteóide, circundadas por osteoblastos, eram observadas em ambos os grupos, no Grupo Laser, o tecido

conjuntivo não estabelecia contato direto com o osso carbonizado. Ainda nesta região, iniciava-se o processo de remodelação óssea, caracterizado pela presença de osteoclastos e osteoblastos no osso original.

14 dias

Aos 14 dias as características do reparo eram semelhantes em ambos os grupos. O defeito apresentava-se totalmente preenchido por tecido conjuntivo frouxo com um infiltrado inflamatório discreto. O tecido conjuntivo era entremeado por trabéculas de osso neoformado com muitos osteócitos e circundadas por osteoblastos com características morfológicas de intensa atividade secretória. Comparativamente, as trabéculas ósseas no Grupo Broca, eram mais finas e esparsas. As margens do defeito de ambos os grupos apresentavam-se em processo de remodelação, onde osso neoformado já era observado substituindo regiões de osso nativo. No Grupo Laser, as linhas basófilas de carbonização que estabeleciam um contato direto com o tecido de reparação, de forma que a neoformação óssea ocorria a partir de áreas onde essa faixa estava ausente.

30 dias

Aos 30 dias, as margens do defeito ósseo já apresentavam-se unidas por osso neoformado em todos os espécimes dos Grupos Laser e Broca. A espessura do osso que ocupa a área do defeito era variável, sendo em alguns casos mais fina ou mais espessa do que da cortical óssea original. O osso neoformado apresentava características de osso jovem, com grande quantidade de osteócitos que distribuíam-se de forma aleatória. As margens do defeito possuíam características de osso extensamente remodelado e eram unidas ao osso neoformado no interior do defeito. No Grupo Laser, a linha de carbonização e a faixa de osso necrótico ainda estavam presentes em todos os espécimes, embora reduzidas pelo processo de

remodelação. Um *gap* era observado entre o osso neoformado e a linha de carbonização.

60 dias

Sessenta dias após a cirurgia, o osso da área cicatrizada já assumia um aspecto mais maduro, conferindo uma espessura uniforme à cortical óssea e orientação longitudinal das lacunas osteocíticas igualmente nos dois grupos estudados. Neste período a linha de carbonização era evidente em alguns espécimes e bastante reduzida em outros. Quando presente, apresentava-se envolta por osso neoformado, mas nunca em contato direto com ele.

Apesar das diferenças morfológicas observadas ao longo do processo de reparo dos defeitos produzidos por LASER e Broca, a análise estatística não evidenciou diferenças significantes nos períodos de estudo em relação à quantidade de osso neoformado que preenchia o defeito. Não obstante, os resultados histomorfométricos apontaram uma tendência de maior neoformação óssea no Grupo Laser em todos os períodos de estudo (Figura 3).

Análise Imuno-histoquímica

Os espécimes de sacrifício imediato não apresentaram alterações na imunomarcação das proteínas estudadas. Também aos 3 dias, como esperado, a expressão de Osteocalcina não foi detectada. As fotomicrografias da imunomarcação das proteínas estudadas são apresentadas nas figuras 4 e 5. A figura 6 apresenta a quantificação média dos níveis de expressão segundo os escores atribuídos. Aos 7 dias, uma expressão elevada desta proteína foi verificada em ambos os grupos experimentais nas camadas de osteoblastos localizados perifericamente às trabéculas neoformadas e na matriz osteóide. Neste período, a porcentagem média de expressão foi maior no Grupo Broca em comparação ao Grupo Laser (90% e 80%, respectivamente). Este padrão inverteu-se aos 14 dias com a diminuição de

expressão de Osteocalcina no Grupo Broca e aumento no Grupo Laser, no entanto, as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significantes.

As expressões de Opg e Rankl foram semelhantes aos 3 dias em ambos os grupos estudados, concentrando-se na região da rede de fibrina e tecido de granulação. O Grupo Laser apresentou um padrão quantitativamente crescente na expressão de Opg dos 3 os 14 dias. No Grupo Broca, observou-se uma diminuição na porcentagem média desta proteína entre 7 e 14 dias e coincidentemente um discreto aumento na expressão de Rankl no mesmo período. Nestes dois períodos, a imunomarcação concentrava-se nas regiões intertrabeculares e nas margens do defeito original.

A expressão de Vegf foi inicialmente detectada aos 3 dias atingindo seu pico aos 7 dias, com um aumento estatisticamente significativo entre os dois períodos no Grupo Laser ($p < 0,05$). Aos 14 dias, a expressão foi novamente diminuída, permanecendo equilibrada entre os dois grupos. A imunomarcação distribuía-se pelo coágulo sanguíneo e tecido de granulação aos 3 dias. Aos 7 e 14 dias, concentrava-se em células endoteliais ao redor de vasos sanguíneos e regiões intertrabeculares na matriz extra-celular.

Finalmente, a intensidade da imunomarcação da proteína Caspase-3 foi evidente aos 3 dias em ambos os grupos com uma tendência aumentada no Grupo Laser, no entanto, aos 7 dias, essa expressão foi significativamente reduzida no Grupo Laser ($p < 0,05$). De modo contrário, no Grupo Broca, a porcentagem média de imunomarcação foi aumentada aos 7 dias, produzindo uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos neste período ($p < 0,05$). Aos 14 dias, a imunomarcação de caspase-3 foi também reduzida no grupo Broca ($p < 0,05$), mantendo níveis semelhantes ao Grupo Laser.

Discussão

Com o objetivo de avaliar o efeito do LASER Er,Cr:YSGG comparado às brocas convencionais sobre o processo de reparo ósseo, ambos os dispositivos foram utilizados na criação de defeitos não críticos em tibia de ratos, um modelo amplamente explorado na literatura dentro das pesquisas de reparo ósseo e biomateriais²¹⁻²⁴. As possíveis variáveis associadas ao preparo da osteotomia foram reduzidas pela padronização dos procedimentos de acordo com estudos prévios. Queiroz et al.²⁵ demonstraram uma alteração no balanço de proteínas da matriz óssea durante o processo de reparo a partir da 13^a perfuração de osso tipo 1 com a mesma broca cirúrgica. Em nosso estudo, as brocas foram substituídas a cada 10 perfurações para que um desgaste excessivo não produzisse sobreaquecimento ósseo. De semelhante forma, a velocidade de perfuração e a irrigação externa foram cuidadosamente controlados durante o preparo dos defeitos.

Os parâmetros ajustados para a osteotomia a LASER foram selecionados segundo informações do fabricante e empregados em um trabalho previamente publicado¹⁹. A potência de 3W, utilizada em nosso estudo é inferior à empregada pela maioria dos estudos de LASER em osso, e demonstrou ser adequada para a produção dos defeitos sem danos teciduais acentuados. Além disso, o modo de “não contato” entre a ponta do cristal de safira e o tecido ósseo também tem demonstrado contribuir para a diminuição dos danos térmicos causados pelo LASER²⁶.

No período de sacrifício imediato os defeitos produzidos pela Broca apresentaram paredes lisas, regulares e paralelas entre si, ao contrário do Grupo Laser, onde as paredes eram irregulares e inclinadas da superfície do defeito em direção à porção inferior. Diferentemente das brocas, que possuem um desenho pré-determinado, a osteotomia à LASER é produzida à mão livre por um feixe de luz de 600µm de diâmetro o que dificulta o desenho preciso da osteotomia em regiões profundas. A dificuldade em produzir osteotomias

profundas foi observada por outros autores que utilizaram LASER Er,Cr:YSGG na produção de alvéolos cirúrgicos para implantes. Esta limitação representa um desafio técnico para uma utilização mais ampla do equipamento em cirurgias ósseas^{27,28}.

Quando comparados os dados das análises histomorfométrica e imuno-histoquímica, observa-se que o início da neoformação óssea ocorreu em ambos os grupos aos 7 dias, o que coincide com o pico de expressão de Osteocalcina. Aos 14 dias, porém, os níveis desta proteína foram reduzidos no grupo Broca e aumentados no Grupo Laser. Coincidentemente aos 14 dias, os achados morfológicos demonstraram um tecido conjuntivo bem diferenciado, trabéculas ósseas mais espessas e uma maior porcentagem média de neoformação óssea no Grupo Laser. Estes dados corroboram os achados de Wang et al.¹¹ e Perussi et al.¹⁹ que demonstraram, histologicamente, um processo de reparo mais adiantado nos defeitos produzidos pelo LASER Er,Cr:YSGG aos 14 dias comparado a osteotomias por brocas.

Os resultados de nosso estudo demonstraram uma tendência de maior neoformação óssea dos defeitos produzidos pelo LASER e este fato pode estar relacionado a expressões aumentadas de Vegf e Osteocalcina aos 7 e 14 dias, respectivamente. Tal vantagem no processo de reparo a LASER comparado a brocas convencionais é também confirmada por outros trabalhos na literatura^{11,19}. Quando analisado o dano térmico produzido pela ablação a LASER sobre o tecido ósseo, essa vantagem reparativa torna-se contraditória, uma vez que nas osteotomias produzidas pela broca o dano tecidual microscopicamente detectável não é tão acentuado. Diante disso é importante entender que o mecanismo pelo qual os dois aparelhos produzem a osteotomia é completamente diferente. Enquanto a luz LASER não necessita de contato para ablacionar o tecido mineralizado, os sistemas rotatórios, necessariamente, exercem uma pressão e atrito sobre o osso, sem os quais seria impossível romper sua estrutura mineralizada. Este conceito nos leva a questionar qual das variáveis – atrito/pressão ou dano térmico – traria maior prejuízo ao processo de reparo, ou em outras

palavras, qual dessas agressões seria mais facilmente superada pelos mecanismos de reparo tecidual.

É bem sabido que as forças mecânicas aplicadas ao osso movimentam os fluidos intersticiais presente no interior de canaliculos e lacunas osteocíticas, compartilhando o estresse em nível celular e deformando a membrana dos osteócitos. Os osteócitos, por sua vez, podem modular a reabsorção ou aposição óssea de acordo com cargas mecânicas aplicadas sobre ele, ativando a osteoclastogênese, ou suprimindo a função osteoblástica^{29,30}. De acordo com Seeman³¹, a morte dos osteócitos é uma das maneiras de se definir a localização e a extensão da lesão tecidual, de forma que a apoptose precede a osteoclastogênese sendo um meio de detectar-se onde a reabsorção óssea é necessária⁷.

No presente trabalho, quando analisada a expressão de Caspase-3, é possível deduzir que o processo de apoptose é mais intenso no Grupo Laser aos 3 dias, sendo significativamente reduzido aos 7 dias. Por outro lado, os níveis de Caspase-3 no Grupo Broca permanecem elevados aos 7 dias. A partir destes resultados é possível deduzir que a ablação a LASER no tecido ósseo produz uma agressão intensa, porém de curta duração; ao passo que a osteotomia produzida pela atrição mecânica da broca parece produzir um efeito mais prolongado sobre a apoptose celular, o que poderia levar a uma maior reabsorção óssea. Os níveis de Rankl e Opg demonstraram-se semelhantes entre os grupos, no entanto, aos 14 dias, é possível observar um aumento de Opg e diminuição de Rankl no Grupo Laser, o que indica uma tendência de menor formação de osteoclastos neste grupo. Também é importante frisar que as expressões de Opg e Rankl não são a única via pela qual os osteócitos modulam a dinâmica de reabsorção/neoformação óssea³².

Um importante fato demonstrado pela análise morfológica é a presença de uma linha basófila de carbonização seguida que é seguida por uma faixa de necrose óssea ambas observadas no Grupo Laser. Esta camada de carbonização é produzida no momento da

ablação do LASER e persiste ao longo de todos os períodos estudados, como também observado em outros trabalhos empregando o LASER Er,Cr:YSGG e Er:YAG^{10,11,17,19,33}. El Montaser et al.¹⁰ descreveram a formação de uma camada de carbonização constituída por uma massa densa de carbono, seguida por uma faixa de necrose óssea após osteotomia com LASER Er:YAG em calota de ratos. Esta camada persistiu após um período de 105 dias de reparo e foi analisada por meio de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) por Sasaki et al.³⁴ que observaram uma discreta alteração na proporção cálcio/fósforo e uma redução da porção orgânica da matriz óssea, com a presença de micro-fraturas distribuídas ao longo do osso carbonizado. Por outro lado, Kimura et al.¹⁵ não encontraram alteração nos níveis de Ca/P nas bordas de defeitos produzidos por LASER Er,Cr:YSGG. Não é possível afirmar que a constituição química da camada de carbonização produzida pelo LASER Er:YAG, e pelo LASER Er,Cr:YSGG seja a mesma, especialmente quando consideradas as variações nos parâmetros do LASER empregados pelos diversos trabalhos. Contudo, o padrão de formação óssea encontrado nos estudos prévios e os descritos no presente estudo coincidem ao demonstrar que a faixa de carbonização persiste ao longo dos períodos tardios, não havendo contato direto entre ela e o tecido ósseo viável. Nossos resultados permitem inferir que a presença da área de carbonização não é um fator que impede a neoformação óssea, porém sua reabsorção é lenta, e a neoformação não ocorre em contato com essa área, sendo observada apenas onde essa faixa foi previamente reabsorvida. Com o intuito de aprimorar a utilização dos LASERS em cirurgias ósseas, pesquisas futuras devem ser direcionadas para identificar a real constituição da faixa de carbonização óssea e seu comportamento histológico. Além disso seria interessante investigar possíveis formas de evitar, ou ao menos, reduzir a extensão da área de carbonização e necrose.

Conclusão

A análise dos dados do presente estudo, tomados em conjunto, indicam que a osteotomia com LASERS Er,Cr:YSGG produz cortes irregulares com zonas de carbonização observáveis em nível microscópico, no entanto, o reparo ósseo não é comprometido em função destas características. Adicionalmente, nossos resultados sugerem que a neoformação óssea é acelerada nas osteotomias a LASERS devido a uma expressão aumentada de Osteocalcina e Vegf nos períodos iniciais do reparo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo fomento provido a esta pesquisa (Processos 2010/07712-8, 2010/16645-2).

Referências

1. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 1981;52(2):155-70.
2. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont.* 1998 Sep-Oct;11(5):391-401.
3. Chim SM, Tickner J, Chow ST, Kuek V, Guo B, Zhang G, et al. Angiogenic factors in bone local environment. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013 Jun;24(3):297-310
4. Gundberg CM. Matrix proteins. *Osteoporos Int.* 2003 Sep;14 Suppl 5:S37-40; discussion S40-2.
5. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001 Dec;142(12):5050-5.

6. Musumeci G, Castrogiovanni P, Loreto C, Castorina S, Pichler K, Weinberg AM. Post-traumatic caspase-3 expression in the adjacent areas of growth plate injury site: a morphological study. *Int J Mol Sci.* 2013 Jul 29;14(8):15767-84
7. Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Väänänen HK. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Oct 7;335(4):1095-101.
8. van As G. Erbium lasers in dentistry. *Dent Clin North Am.* 2004 Oct;48(4):1017-59
9. Parker S. Surgical lasers and hard dental tissue. *Br Dent J.* 2007 Apr 28;202(8):445-54.
10. el Montaser MA, Devlin H, Sloan P, Dickinson MR. Pattern of healing of calvarial bone in the rat following application of the erbium-YAG laser. *Lasers Surg Med.* 1997;21(3):255-61
11. Wang X, Zhang C, Matsumoto K. In vivo study of the healing processes that occur in the jaws of rabbits following perforation by an Er,Cr:YSGG laser. *Lasers Med Sci.* 2005;20(1):21-7
12. Onisor I, Pecie R, Chaskelis I, Krejci I. Cutting and coagulation during intraoral soft tissue surgery using Er: YAG laser. *Eur J Paediatr Dent.* 2013 Jun;14(2):140-5.
13. Fried D, Ashouri N, Breunig T, Shori R. Mechanism of water augmentation during IR laser ablation of dental enamel. *Lasers Surg Med.* 2002;31(3):186-93
14. Freiberg RJ, Cozean CD. Pulsed erbium laser ablation of hard dental tissue: the effects of atomized water spray versus water surface film. *Proc SPIE* 2002;4610:74-84.
15. Kimura Y, Yu DG, Fujita A, Yamashita A, Murakami Y, Matsumoto K. Effects of erbium,chromium:YSGG laser irradiation on canine mandibular bone. *J Periodontol.* 2001 Sep;72(9):1178-82
16. Eriksson R, Albrektsson T. Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: A vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent* 1983;50:101-107.

17. Salina S, Maiorana C, Iezzi G, Colombo A, Fontana F, Piattelli A. Histological evaluation, in rabbit tibiae, of osseointegration of mini-implants in sites prepared with Er:YAG laser versus sites prepared with traditional burs. *J Long Term Eff Med Implants*. 2006;16(2):145-56
18. Stübinger S, Biermeier K, Bächli B, Ferguson SJ, Sader R, von Rechenberg B. Comparison of Er:YAG laser, piezoelectric, and drill osteotomy for dental implant site preparation: a biomechanical and histological analysis in sheep. *Lasers Surg Med*. 2010 Sep;42(7):652-61.
19. Perussi LR, Pavone C, Oliveira GJPL, Cerri OS, Marcantonio RAC. Effects of the Er,Cr:YSGG laser on bone and soft tissue in a rat model. *Lasers Med Sci*. 2012; 27:95–102.
20. dos Santos PL, Queiroz TP, Margonar R, Gomes de Souza Carvalho AC, Okamoto R, de Souza Faloni AP, Garcia IR Jr: Guided implant surgery: what's the influence of this new technique on bone cell viability? *J Oral Maxillofac Surg* 2013, 71:505–512.
21. Esteves JC, Aranega AM, Borrasca AG, Fattah CM, Garcia-Júnior IR. Repair process of surgical defects filled with autogenous bone grafts in tibiae of diabetic rats. *J Appl Oral Sci*. 2008 Sep-Oct;16(5):316-20
22. Barushka O, Yaakobi T, Oron U. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. *Bone*. 1995 Jan;16(1):47-55.
23. Esteves JC, Marcantonio E Jr, de Souza Faloni AP, Rocha FR, Marcantonio RA, Wilk K, Intini G. Dynamics of bone healing after osteotomy with piezosurgery or conventional drilling - histomorphometrical, immunohistochemical, and molecular analysis. *J Transl Med*. 2013 Sep 23;11:221.
24. Park BH, Zhou L, Jang KY, Park HS, Lim JM, Yoon SJ, Lee SY, Kim JR. Enhancement of tibial regeneration in a rat model by adipose-derived stromal cells in a PLGA scaffold. *Bone*. 2012 Sep;51(3):313-23.

25. Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, Margonar R, Pereira-Filho VA, Garcia Júnior IR, et al. Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66(6):1233-40.
26. Wang X, Ishizaki NT, Suzuki N, Kimura Y, Matsumoto K. Morphological changes of bovine mandibular bone irradiated by Er,Cr:YSGG laser: an in vitro study. *J Clin Laser Med Surg*. 2002 Oct;20(5):245-50
27. Schwarz F, Olivier W, Hertel M, Sager M, Chaker A, Becker J. Influence of implant bed preparation using an Er:YAG laser on the osseointegration of titanium implants: a histomorphometrical study in dogs. *J Oral Rehabil*. 2007 Apr;34(4):273-81.
28. Lee SY, Piao C, Heo SJ, Koak JY, Lee JH, Kim TH, Kim MJ, Kwon HB, Kim SK. A comparison of bone bed preparation with laser and conventional drill on the relationship between implant stability quotient (ISQ) values and implant insertion variables. *J Adv Prosthodont*. 2010 Dec;2(4):148-53.
29. Cowin SC. Mechanosensation and fluid transport in living bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002 Mar;2(3):256-60
30. Han Y, Cowin SC, Schaffler MB, Weinbaum S. Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 23;101(47):16689-94.
31. Seeman E. Osteocytes--martyrs for integrity of bone strength. *Osteoporos Int*. 2006 Oct;17(10):1443-8
32. Iolascon G, Resmini G, Tarantino U. Mechanobiology of bone. *Aging Clin Exp Res*. 2013 Oct;25 Suppl 1:S3-7.

33. Shah UK, Poe DS, Rebeiz EE, Perrault DF Jr, Pankratov MM, Shapshay SM. Erbium laser in middle ear surgery: in vitro and in vivo animal study. *Laryngoscope*. 1996 Apr;106(4):418-22.
34. Sasaki KM, Aoki A, Ichinose S, Ishikawa I. Ultrastructural analysis of bone tissue irradiated by Er:YAG Laser. *Lasers Surg Med*. 2002;31(5):322-32

Figuras e Legendas

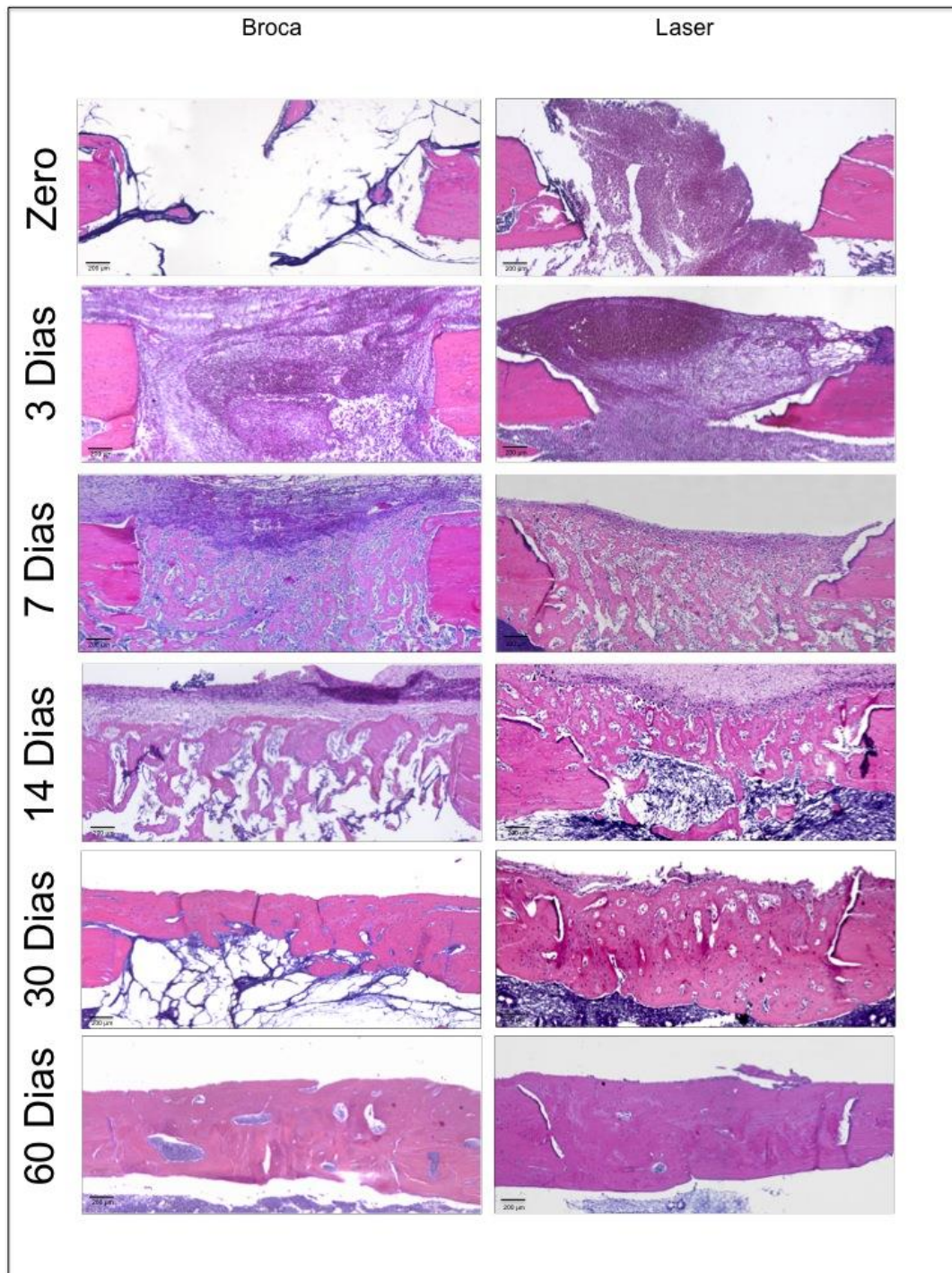


Figura 1: Fotomicrografias do processo de reparo dos defeitos ósseos dos Grupos Broca e Laser obtidas aos zero, 3, 7, 14, 30 e 60 dias pós-operatórios. Hematoxilina & Eosina. Barra: 200 μ m

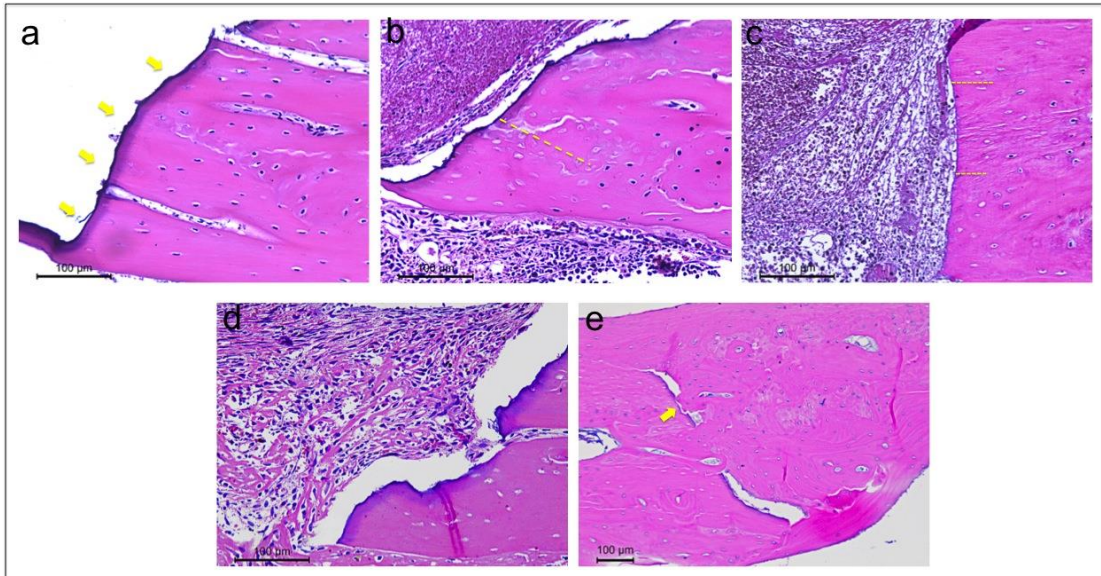


Figura 2: Fotomicrografias de maiores aumentos de regiões de interesse dos defeitos ósseos dos Grupos Broca e laser. (a) Grupo Laser, período de Sacrifício Imediato - Linha basófila de carbonização na margem do defeito ósseo produzido pelo LASER Er,Cr:YSGG (setas amarelas). (b) Grupo Laser aos 3 dias – Margem do defeito ósseo onde se nota a linha basófila de carbonização seguida por uma zona de necrose óssea (Marcada pela linha amarela) caracterizada por osteoplastos, ou seja, lacunas osteocíticas vazias. (c) Grupo Broca aos 3 dias – Faixa de necrose óssea na margem do defeito cirúrgico (Linhas amarelas), note a dimensão reduzida da zona de necrose comparada ao Grupo Laser no mesmo período. (d) Grupo Laser aos 7 dias – Região marginal do defeito ósseo. Um tecido conjuntivo frouxo exibindo diversas células inflamatórias preenche a região central do defeito. Contudo não há um contato direto entre este tecido e a zona de carbonização. (e) Grupo Laser aos 60 dias – Defeito ósseo totalmente reparado por osso neoformado. Note a persistência das linhas de carbonização e o *gap* existente entre ela e o osso neoformado. Nos pontos onde a área carbonizada é reabsorvida, a margem do defeito apresenta-se unida ao osso neoformado. Hematoxilina & Eosina, Barra 100 μ m.

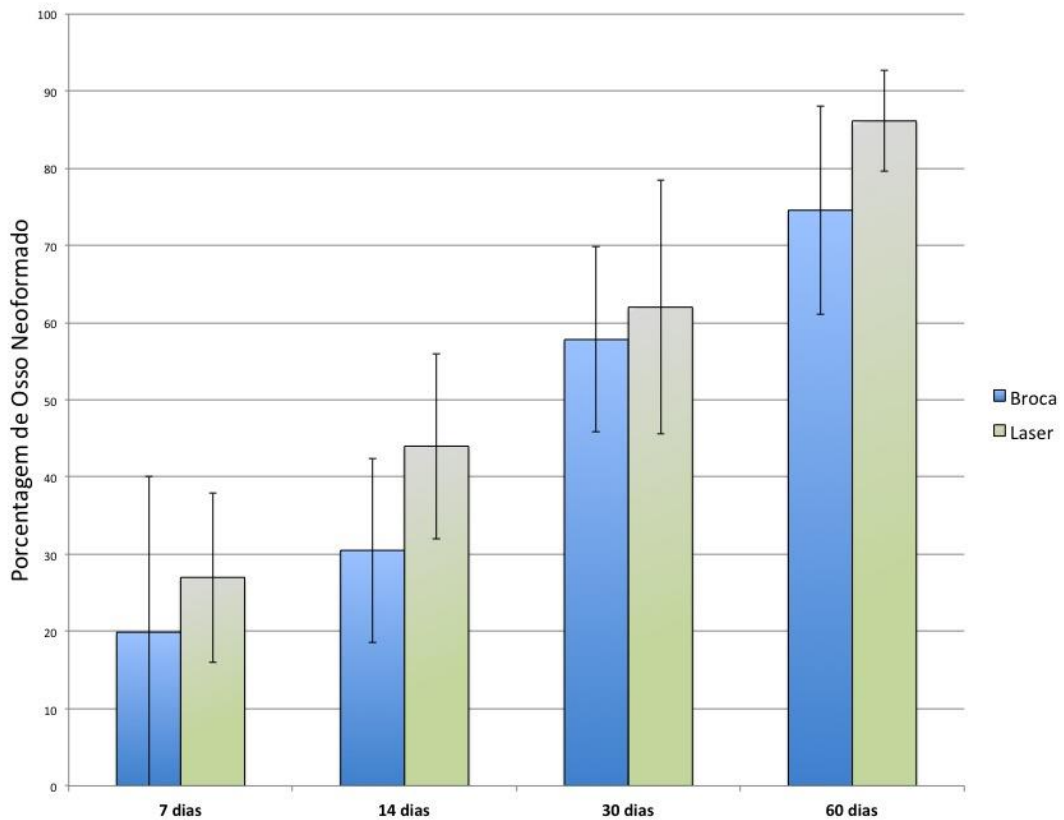


Figura 3: Valores de Média \pm Desvio Padrão das Porcentagens média de neoformação óssea aos 7, 14, 30 e 60 dias mensurados no interior dos defeitos produzidos pelos sistemas de osteotomia testados. O teste one-way ANOVA não detectou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos comparando-os nos diferentes períodos pós-operatórios.

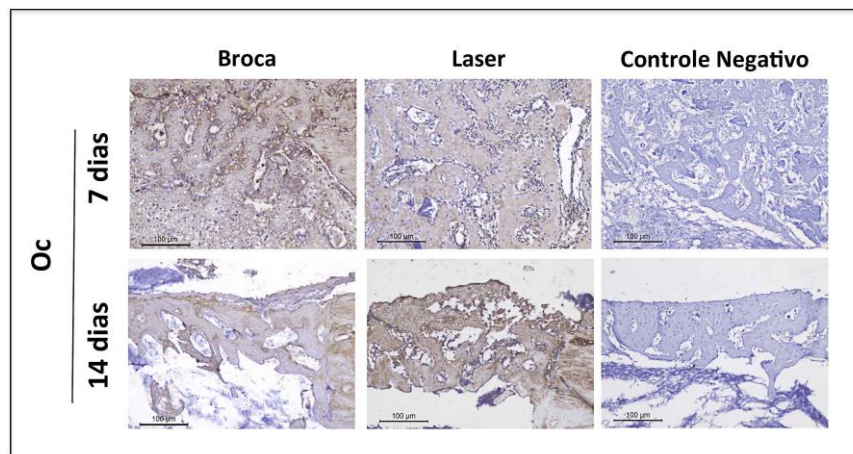


Figura 4: Fotomicrografias de porções dos defeitos ósseos produzidos por Broca ou LASER Er,Cr:YSGG e analisados após períodos de 7 e 14 pós-operatórios. Imuno-histoquímica para detecção de Osteocalcina (marrom), contra-corada por Hematoxilina. Aos 7 dias a marcação hiperpositiva é observada no osso neoformado e especialmente na faixa de osteoblastos ao redor do tecido osteóide em ambos os grupos. Porém a imunomarcação no Grupo Broca apresenta-se mais intensa. Aos 14 dias observa-se imunomarcação hiperpositiva no Grupo Laser e Superpositiva no Grupo Broca. Barra 100 μ m.

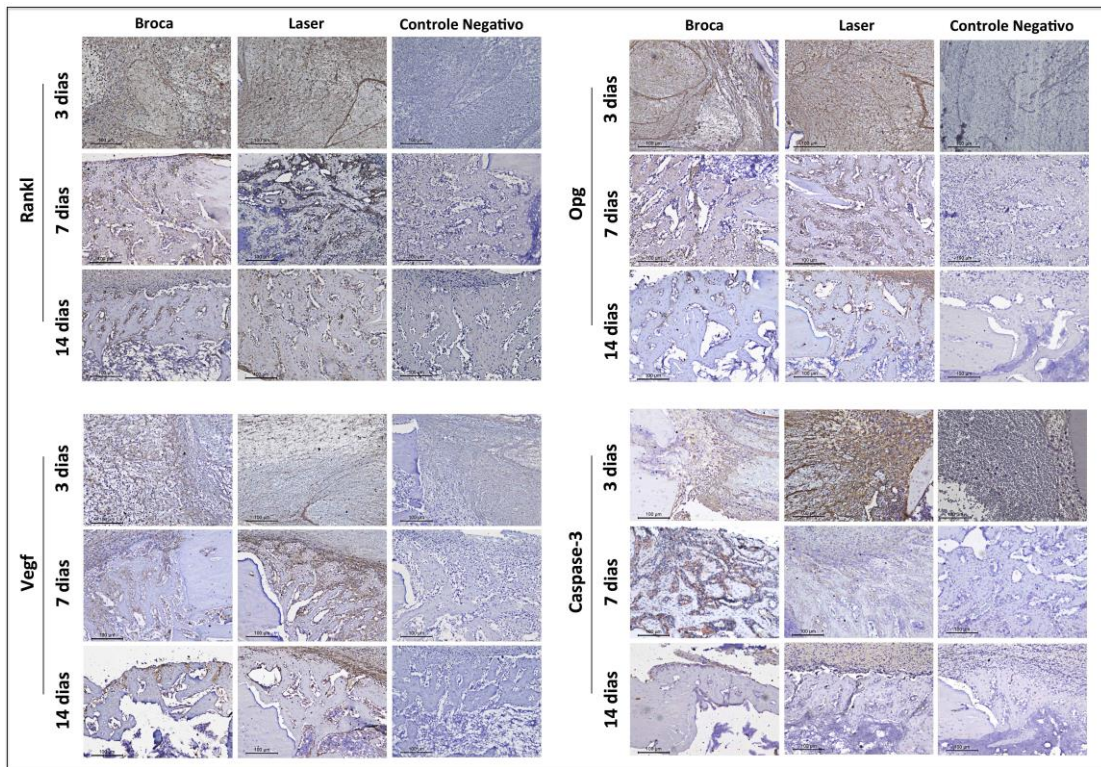


Figura 5: Fotomicrografia de porções de defeitos ósseos produzidos por Broca ou LASER Er,Cr:YSGG analisadas aos 3, 7 e 14 dias pós-operatórios. Imuno-histoquímica para detecção de Rankl, Opg, Vegf e Caspase 3 (marrom) contra-coradas por hematoxilina. **Rankl:** Imunomarcção superpositiva aos 3 dias em ambos os grupos. Aos 7 dias a intensidade de marcação no Grupo Laser foi maior, tendendo a hiperpositiva. Aos 14 dias, a marcação distribuía-se especialmente no periosteio e nos espaços inter-trabeculares com intensidade Superpositiva no Grupo Broca e Positiva no Grupo Laser. **Opg:** Aos 3 dias uma imunomarcção superpositiva é observada em ambos os grupos. Aos 7 dias a intensidade de marcação no grupo broca é hiperpositiva e mais intensa do que a do Grupo Laser (superpositiva). Tanto a matriz óssea neoformada quanto a linha periférica de osteócitos/osteoclastos apresentam positividade para Opg neste período. Aos 14 dias a intensidade da imunomarcção no Grupo Laser é hiperpositiva com coloração mais intensa que o Grupo Broca no mesmo período (superpositivo). **Vegf:** Aos 3 dias a imunomarcção positiva em ambos os grupos está presente no coágulo sanguíneo, observando-se marcação ligeiramente mais intensa no Grupo Broca. Aos 7 dias, a intensidade da marcação é superpositiva no Grupo Broca e Hiperpositiva no Grupo Laser, sendo localizada no tecido conjuntivo, especialmente ao redor de vasos sanguíneos. Aos 14 dias a intensidade se iguala em ambos os grupos, quando a imunomarcção de Vegf concentra-se no tecido conjuntivo inter-trabecular. **Caspase-3:** A intensidade de marcação de caspase-3 aos 3 dias é maior no Grupo Laser (hiperpositiva) comparado ao Grupo Broca (Superpositiva). Aos 7 dias este padrão é invertido, onde se observa imunomarcção hiperpositiva no Grupo Broca e positiva no Grupo Laser. Já aos 14 dias a expressão de Caspase -3 é equilibrada (positiva) em ambos os grupos. Barra 100µm.

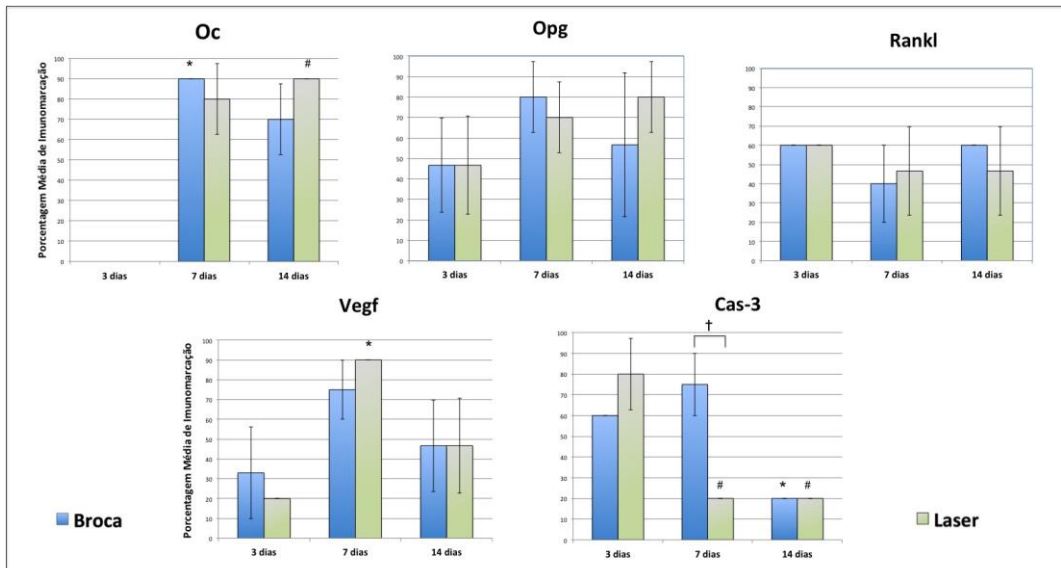


Figura 6: Média \pm Desvio Padrão dos percentis da imunomarcção para detecção de Osteocalcina (Oc), Osteoprotegerina (Opg), Rankl, Vegf e Caspase 3 (Cas-3) aos 3, 7 e 14 dias. Oc: * $p < 0.05$ relativo a 3 dias, # $p < 0.05$ relativo a 3 dias; Vegf * $p < 0.05$ relativo a 3 dias; Cas-3 † $p < 0.05$ entre os grupos Broca e Laser aos 7 dias, # $p < 0.05$ relativo a 3 dias, * $p < 0.05$ relativo a 7 dias.

4 Conclusão

1. Os alvéolos cirúrgicos preparados pelos três dispositivos testados: Broca, Ultrassom Cirúrgico e LASER Er,Cr:YSGG possibilitaram a osseointegração de implantes de titânio.
2. Broca e Ultrassom produzem osteotomias com paredes mais lisas e regulares do que o LASER Er,Cr:YSGG.
3. As osteotomias produzidas por LASER produzem uma linha de carbonização do tecido ósseo.
4. Apesar de produzir uma maior lesão aos tecidos adjacentes à osteotomia, o processo de reparo de defeitos não-críticos produzidos por LASER Er,Cr:YSGG parecem ser mais acelerados nos períodos iniciais.
5. A quantidade de osso neoformado é comparável em defeitos ósseos produzidos pelos três dispositivos testados.
6. A expressão de fatores de crescimento ósseo dentre outras moléculas ativadoras do processo de reparo não é maior em osteotomias produzidas por Ultrassom Piezoelétrico.
7. Sob o ponto de vista histológico, o LASER Er,Cr:YSGG e Ultrassom Cirúrgico são efetivos para produção de osteotomias.

5 Referências*

* De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vanouwer. Disponível no site <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

- 1 Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants: Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone to implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981; 52(2): 155-9.
- 2 Annibali S, Ripari M, La Monaca G, Tonoli F, Cristalli MP. Local accidents in dental implant surgery: prevention and treatment. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2009; 29(3): 325-31.
- 3 Azzeh MM. Er,Cr:YSGG laser-assisted surgical treatment of peri-implantitis with 1-year reentry and 18-month follow-up. *J Periodontol*. 2008; 79(10): 2000-5.
- 4 Barone A, Santini S, Marconcini S, Giacomelli L, Gherlone E, Covani U. et al. Osteotomy and membrane elevation during the maxillary sinus augmentation procedure. A comparative study: Piezoelectric device vs. conventional rotative instruments. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19(5): 511-13.
- 5 Bengazi F, Lang NP, Canciani E, Viganò P, Velez JU, Botticelli D. Osseointegration of implants with dendrimers surface characteristics installed conventionally or with Piezosurgery®. A comparative study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2014; 25(1): 10-5.
- 6 Benington IC, Biagioni PA, Briggs J, Sheridan S, Lamey PJ. Thermal changes observed at implant sites during internal and external irrigation. *Clin Oral Implants Res*. 2002;13(3): 293-7
- 7 Benington IC, Biagioni PA, Sheridan S, Lamey PJ. Electronic thermographic measurement of bone preparation for irrigation comparing internal and external irrigation. *J Dent Res*. 1997; 76(4): 1065-9.
- 8 da Silva Neto UT, Joly JC, Gehrke SA. Clinical analysis of the stability of dental implants after preparation of the site by conventional drilling or piezosurgery. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014; 52(2): 149-53.
- 9 Danza M, Guidi R, Carinci F. Comparison between implants inserted into piezo split and unsplit alveolar crests. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 67(11): 2460-5.

- 10 Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*. 1998; 11(5): 391-401.
- 11 Ercoli C, Funkenbusch PD, Lee HJ, et al. The influence of drill wear on cutting efficiency and heat production during osteotomy preparation for dental implants: a study of drill durability. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004; 19(3): 335-9.
- 12 Eriksson R, Albrektsson T. Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: A vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent*. 1983; 50(1): 101-7.
- 13 Eversole LR, RizoIU IM. Preliminary investigations on the utility of an erbium, chromium YSGG laser. *J Calif Dent Assoc*. 1995; 23(12): 41-7.
- 14 Food and Drug Administration [Internet]. Summary of safety and effectiveness Information: Waterlase Millennium, hydrokinetic tissue cutting system [cited 2010 May 20]. Available from: http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf9/k090181.pdf.
- 15 Franzen R, Esteves-Oliveira M, Meister J, Wallerang A, Vanweersch L, Lampert F, et al. Decontamination of deep dentin by means of erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser irradiation. *Lasers Med Sci*. 2009; 24(1): 75-80.
- 16 Hadley J, Young DA, Eversole LR, Gornbein JA. A laser-powered hydrokinetic system for caries removal and cavity preparation. *J Am Dent Assoc*. 2000; 131(6): 777-85.
- 17 Hakki SS, Berk G, Dundar N, Saglam M, Berk N. Effects of root planing procedures with hand instrument or erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser irradiation on the root surfaces: a comparative scanning electron microscopy study. *Lasers Med Sci*. 2010; 25(3): 345-53.
- 18 Happe A. Use of a piezoelectric surgical device to harvest bone grafts from the mandibular ramus: report of 40 cases. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2007; 27(3): 241-9.

- 19 Jahan KMR, Hossain M, Nakamura Y, Yoshishige Y, Kinoshita JI, Matsumoto K. An assessment following root canal preparation by Er,Cr:YSGG laser irradiation in straight and curved roots, in vitro. *Lasers Med Sci.* 2006; 21(4): 229-34.
- 20 Kfoury FD, Duailibi MT, Bretos JL, Carvalho AB, Pallos D, Duailibi SE. Piezoelectric osteotomy for the placement of titanium implants in rabbits: histomorphometry study. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Jul 8. [Epub ahead of print] doi: 10.1111/clr.12229.
- 21 Kimura Y, Yu DG, Fujita A, Yamashita A, Murakami Y, Matsumoto K. Effects of erbium,chromium:YSGG laser irradiation on canine mandibular bone. *J Periodontol* 2001; 72(9): 1178-82.
- 22 Lee CY. A new method to harvest ramus bone using the erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 63(6): 879-82.
- 23 Lee SY, Piao C, Heo SJ, Koak JY, Lee JH, Kim TH, et al. A comparison of bone bed preparation with laser and conventional drill on the relationship between implant stability quotient (ISQ) values and implant insertion variables. *J Adv Prosthodont.* 2010; 2(4): 148-53.
- 24 Metzger MC, Bormann KH, Schoen R, et al. Inferior alveolar nerve transposition—An in vitro comparison between piezosurgery and conventional bur use. *J Oral Implantol.* 2006; 32(1): 19-25.
- 25 Misch CE. Cirurgia para implante com forma radicular na mandíbula edêntula: estágio I inserção do implante. In: Misch CE. *Implantes dentários contemporâneos.* São Paulo: Santos; 2006. p. 347-69.
- 26 Pavone C, Perussi LR, de Oliveira GJ, Scardueli CR, Cirelli JA, Cerri PS, et al. Effect of Er,Cr:YSGG laser application in the treatment of experimental periodontitis. *Lasers Med Sci.* 2014 Jan 30. [Epu ahead of print] doi: 10.1007/s10103-014-1526-3

- 27 Perussi LR, Pavone C, Oliveira GJPL, Cerri OS, Marcantonio RAC. Effects of the Er,Cr:YSGG laser on bone and soft tissue in a rat model. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(1): 95–102.
- 28 Preti G, Martinasso G, Peirone B, Navone R, Manzella C, Muzio G, et al. Cytokines and growth factors involved in the osseointegration of oral titanium implants positioned using piezoelectric bone surgery versus a drill technique: a pilot study in minipigs. *J Periodontol.* 2007; 78(4): 716-22.
- 29 Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, Margonar R, Pereira-Filho VA, Garcia Júnior IR, et al. Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66(6): 1233-40.
- 30 Salina S, Maiorana C, Iezzi G, Colombo A, Fontana F, Piattelli A. Histological evaluation, in rabbit tibiae, of osseointegration of mini-implants in sites prepared with Er:YAG laser versus sites prepared with traditional burs. *J Long Term Eff Med Implants.* 2006; 16(2): 145-56
- 31 Schwarz F, Olivier W, Herten M, Sager M, Chaker A, Becker J. Influence of implant bed preparation using an Er:YAG laser on the osseointegration of titanium implants: a histomorphometrical study in dogs. *J Oral Rehabil.* 2007; 34(4): 273-81.
- 32 Soares FM, Tarver EJ, Bimstein E, Shadoux LM, Bhattacharvya I. Gingival overgrowth in a child with arthrogyrosis treated with an Er,Cr:YSGG laser: a case report. *Pediatric Dent.* 2009; 31(1): 8-13.
- 33 Stübinger S, Biermeier K, Bächli B, Ferguson SJ, Sader R, von Rechenberg B. Comparison of Er:YAG laser, piezoelectric, and drill osteotomy for dental implant site preparation: a biomechanical and histological analysis in sheep. *Lasers Surg Med.* 2010; 42(7): 652-61

34 Vercellotti T, Crovace A, Palermo A, Molfetta L. The piezoelectric osteotomy in orthopaedics: clinical and histological evaluations (pilot study in animal). *Mediterr J Surg Med.* 2001; 9(1):89-96.

35 Vercellotti T. Technological characteristics and clinical indications of piezoelectric bone surgery. *Minerva Stomatol.* 2004; 53(5): 207-10.

36 Wang X, Zhang C, Matsumoto K. In vivo study of the healing processes that occur in the jaws of rabbits following perforation by an Er,Cr:YSGG laser. *Lasers Med Sci.* 2005; 20(1):21-7.

6 Apêndices

Apêndice 1

Material e Método

Estudo 1

O objetivo deste estudo foi avaliar a dinâmica do processo de formação óssea ao redor de implantes inseridos em leitos cirúrgicos preparados por Brocas, Ultrassom Cirúrgico ou laser Er,Cr:YSGG, por meio de análise Biomecânica e Histométrica .

Neste estudo foram utilizados 144 ratos *Rattus Norvegicus*, variação *albinus*, Holtzman, machos, adultos, de aproximadamente 4 meses de idade, com massa corporal média de 450 gramas, mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara (FOAr-UNESP), alimentados com ração sólida e com acesso a água *ad libitum*, antes e durante todo o período experimental, em ambiente com luz, temperatura e higiene controladas, sendo que suas gaiolas foram identificadas pelo nome do pesquisador responsável, massa corpórea do animal, data da cirurgia e do sacrifício, conforme o grupo e período, também apontados.

Os animais foram randomicamente divididos, por meio de sorteio, em 3 grupos com 48 animais cada, que foram avaliados em seis diferentes períodos experimentais – zero, 3, 7, 14, 30 e 60 dias - com 8 animais em cada período.

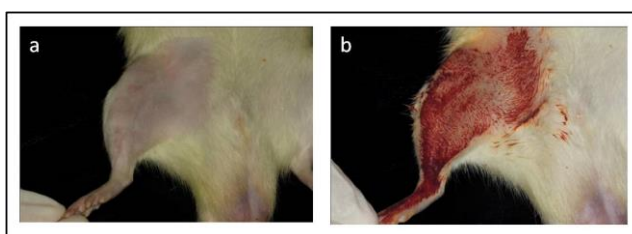
Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com uma combinação de Cloridrato de Xilazina (Francotar, Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda., São Paulo, Brasil) na dosagem de 0,04ml/100g de massa corporal, para promover o relaxamento muscular; e na

sequência, Cloridrato de Quetamina (Vyrbaxil, Virbac do Brasil Ind Com, Ltda, São Paulo, Brasil.) na proporção de 0,08 ml/100g de massa corporal para anestesia.

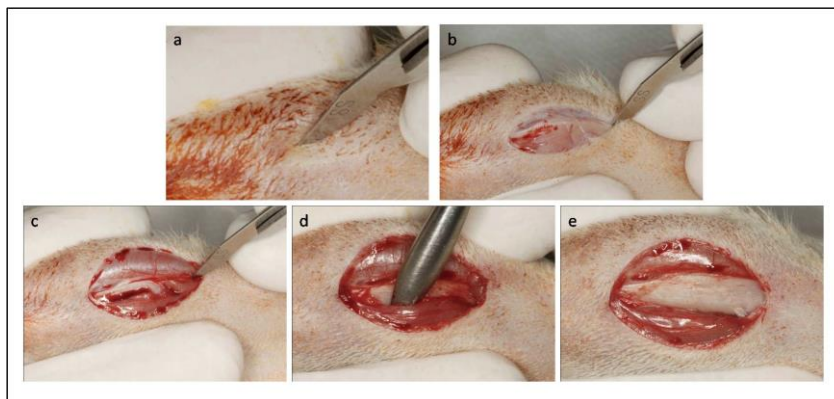
Os animais foram submetidos à tricotomia da região ântero-lateral das tíbias direita e esquerda, seguida por anti-sepsia do campo cirúrgico com gaze esterilizada, embebida em solução de PVP-I 10% com 1% de iodo ativo, e então, posicionados em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica (Figura 1).

Figura 1 - Tricotomia (a) e anti-sepsia (b) do membro inferior do animal



A seguir, com uma lâmina de bisturi nº 15, montada em cabo número 3, foram realizadas duas incisões lineares de 3 centímetros de extensão no sentido longitudinal da face medial da tíbia, a primeira envolvendo o tecido cutâneo, e a segunda tecido muscular e periosteal. Em seguida realizou-se o descolamento dermo-mio-periosteal do retalho com auxílio de um descolador de periósteo. A metáfise tibial foi exposta para a criação de uma osteotomia de 2 milímetros de diâmetro na cortical medial (Figura 2).

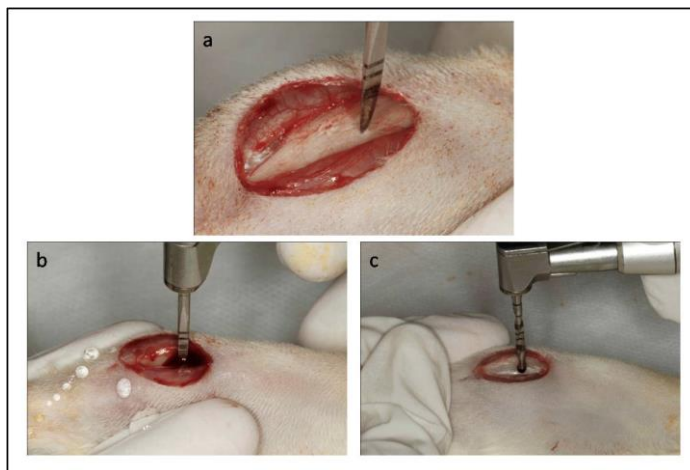
Figura 2 – Procedimento cirúrgico para exposição da metáfise tibial. (a e b) incisão de camada dérmica, (c) incisão do plano periosteal, (d) descolamento do retalho, (e) vista medial da metáfise da tíbia.



Os alvéolos cirúrgicos dos implantes foram criados com Brocas no Grupo Broca, Ultrassom Cirúrgico no Grupo Piezo e LASER Er,Cr:YSGG no Grupo Laser da seguinte maneira:

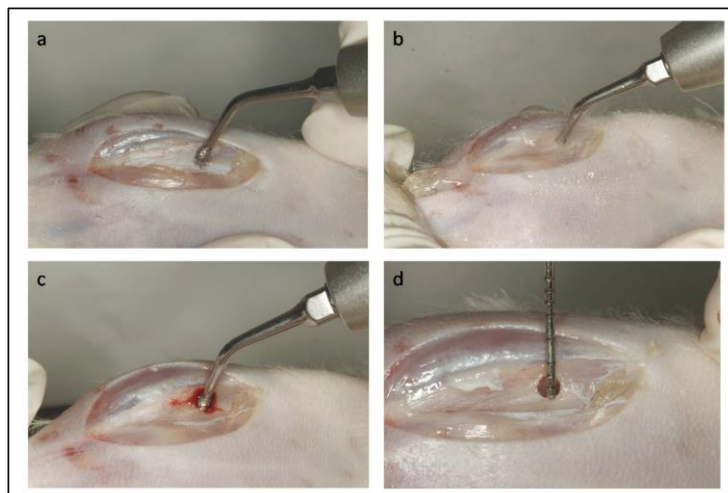
Grupo Broca: Foi utilizada fresa de aço inoxidável cirúrgico acoplada em contra-ângulo redutor (20:1) (Peça Angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, Kavo®, Kaltenbach&VoigtGmbH& Co., Biberach, Alemanha) montado em um motor elétrico com bomba peristáltica (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil), com velocidade de 1200rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio 0,9% (Fisiológico, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil). A osteotomia foi realizada com uma sequência progressiva de fresas (fresa lança seguida por fresa helicoidal de 2mm) (Figura 3). As fresas foram trocadas a cada 10 perfurações para que seu desgaste não gerasse superaquecimento ósseo.

Figura 3 - Grupo Broca: Preparo do defeito cirúrgico com fresas. (a) Posicionamento da fresa lança, (b) perfuração com fresa lança sob irrigação, (c) perfuração com a fresa 2.0mm.



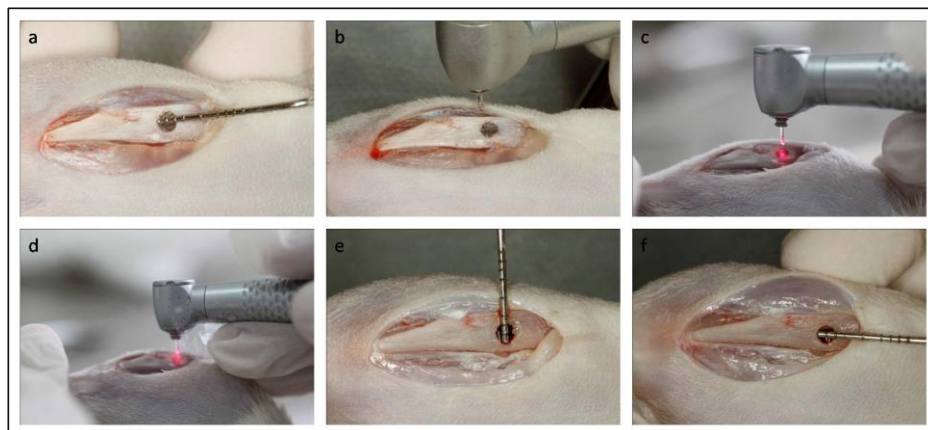
Grupo Piezo: Foi utilizado o Ultrassom Piezoelétrico Piezon Master Surgery® (Electro Medical Systems-EMS®, Nyon, Suíça) com vibrações ultrassônicas de um transdutor piezoelétrico a uma frequência de 29 kHz e oscilação (amplitude) de 60 a 200 μm . O preparo dos leitos receptores foi efetuado com uma ponta esférica SL2, de 2mm de diâmetro (Electro Medical Systems-EMS®, Nyon, Suíça), sob irrigação interna, com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Figura 4 - Grupo Piezo: Preparo do defeito cirúrgico com Ultrassom Piezoelétrico. (a) Posicionamento da ponta, (b e c) perfuração sob irrigação, (d) defeito de 2mm de diâmetro (e).



Grupo Laser: Neste grupo foi utilizado o LASER de alta intensidade Er,Cr:YSGG (Erbium-Cromium:Ytrium, Scandium, Gallium, Garnet – Waterlase®, Biolase, Estados Unidos) com os seguintes parâmetros: 2,78 μ m de comprimento de onda, 20Hz de frequência, 150mJ de energia de pulso, 3W de potência, 50% de emissão de água/ar. Um cristal de safira de 600 μ m de espessura e 6mm de comprimento (ponta G4 - Waterlase®, Biolase, Estados Unidos) aplicava a luz sobre o tecido alvo no modo “~~n~~ão contato”, distando 2mm da superfície óssea, mantido perpendicularmente a ela. O diâmetro do defeito foi previamente delimitado por meio de grafite esterilizado (Figura 5).

Figura 5 - Grupo Laser: Preparo do defeito cirúrgico com LASER Er,Cr:YSGG. (a) delimitação da área do defeito, (b e c) posicionamento do LASER sobre a área a ser perfurada, (d) osteotomia com LASER no modo “~~n~~ão contato” sob irrigação água/ar 50%. (e e f). Defeito ósseo final com 2mm de diâmetro.

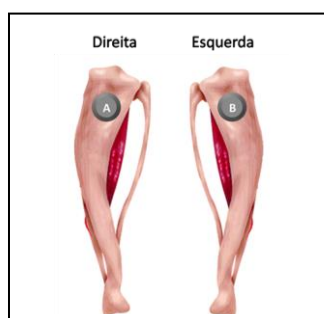


Uma vez preparado o defeito, implantes de titânio comercialmente puro com superfície usinada, esterilizados por raios gama, com dimensões de 2,2mm de diâmetro por 4mm de comprimento (Conexão Sistema de Prótese, Arujá-SP, Brasil), desenvolvidos especificamente para fins experimentais foram instalados em ambas as tíbia do animal utilizando chave manual (Figura 6 e 7). Após a instalação do implante, a ferida cirúrgica foi suturada com pontos simples interrompidos. O implante instalado na tíbia direita foi utilizado para o ensaio de torque de remoção. O implante instalado na tíbia esquerda foi usado para a análise histométrica.

Figura 6 - Inserção do mini-implante com chave manual (a e b). Sutura com pontos simples interrompidos (c).



Figura 7 - Desenho esquemático ilustrando os pontos de posicionamento dos dois implantes nas tíbias direita (A) e esquerda (B).



Após o procedimento cirúrgico, todos os animais receberam dose única de 20.000 UI de penicilina G benzatina (Fontoura, Wyeth S.A. Indústrias Farmacêuticas, São Bernardo do Campo, SP, Brasil), por via intra-muscular e três gotas de paracetamol por gavagem (15mg/Kg) (Tylenol bebe® – Janssen-Cilag Farmacêutica LTDA).

Os animais foram sacrificados de acordo com os períodos de estudo: zero, 3, 7, 14, 30 e 60 dias por meio de dose excessiva de anestésico - Cloridrato de Quetamina (Quetamin® - Virbac do Brasil Ltda, Brasil.). A distribuição dos animais segundo o grupo experimental e período pós-operatório são apresentados na Tabela 1:

Tabela 1 Numero de animais distribuídos nos diferentes períodos e grupos experimentais:

Grupos	Período de Sacrifício						Total
	Zero	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	
Grupo Fresa	8	8	8	8	8	8	48 animais
Grupo Piezo	8	8	8	8	8	8	48 animais
Grupo Laser	8	8	8	8	8	8	48 animais

ENSAIO BIOMECÂNICO – TORQUE DE REMOÇÃO

A análise de torque de remoção foi realizada logo após o sacrifício dos animais. As áreas operadas foram reabertas e os parafusos expostos. O implante inserido na tíbia direita foi usado para esta análise. Uma força de contra-torque foi aplicada usando um Torquímetro Digital (Torque Meter - Instrutherm[®], São Paulo-SP, Brasil) (Figura 8). O teste foi realizado aumentando-se o torque em sentido anti-horário até que o implante girasse dentro do osso, rompendo completamente a interface osso/implante. Neste momento, o *display* do torquímetro registrava a força necessária para ruptura da osseointegração. Os dados foram anotados e tabulados para posterior análise estatística.

Figura 8 - Torquímetro Digital utilizado para mensuração do Torque de Remoção dos implantes.



Obtenção das peças e processamento laboratorial

Após o sacrifício dos animais, as tíbias esquerdas, contendo os implantes, foram removidas e tiveram todo o tecido mole dissecado. O espécime ósseo foi reduzido à área do implante com uma margem de segurança de 1cm. Em seguida, essas peças foram fixadas em formol tamponado neutro a 4% por 48 horas. As peças foram preparadas para cortes não descalcificados pelo sistema Exakt (EXAKT Apparatebau GmbH & Co., Norderstedt, Germany).

Após o processo de fixação procedeu-se à lavagem dos fragmentos ósseos com água por 24 horas. Os espécimes foram, então, gradativamente desidratados em solução de álcool

etílico (60%, 80%, 96%, 100%, 100%) durante 1 semana em cada solução. A infiltração plástica foi feita com misturas de glicolmetacrilato (Technovit 7200 VLC - Kulzer, Wehrheim, Alemanha) e álcool etílico, seguindo variações gradativas, 30 e 70; 50 e 50; 70 e 30, respectivamente, finalizando com duas infiltrações de glicolmetacrilato puro. Após a infiltração plástica, os espécimes foram incluídos em resina e polimerizados durante 10 horas.

Os blocos foram removidos do molde e montados em uma lâmina acrílica com o auxílio da resina Technovit 4000 (Kulzer, Wehrheim, Alemanha). Utilizando-se um sistema de secção (EXAKT Cutting System, Apparetebau GmbH, Hamburgo, Alemanha), realizou-se o corte preliminar para obtenção de uma secção espessa (300-500 µm). Esta secção foi submetida a um sistema de micro desgaste, que resultou em uma secção de aproximadamente 50 a 70 µm de espessura da porção mais central do implante. As lâminas histológicas foram coradas com Stevenel's Blue e Fuccina Ácida a 1%.

Análise Histométrica

Primeiramente as lâminas foram codificadas visando não influenciar o examinador durante a análise. Cada lâmina codificada foi analisada de forma aleatória por um examinador cego para os grupos e previamente treinado. Para avaliação do tecido ósseo próximo ao implante, duas análises foram conduzidas:

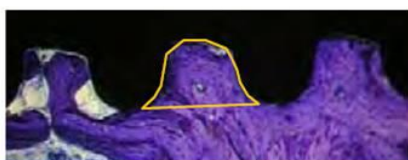
a) Contato –osso-implante (BIC): extensão linear do implante apresentando tecido ósseo em contato com o metal, entre as duas espiras iniciais do implante, na mesial e distal (Figura 9);

Figura 9 - Contato-osso-implante: mensuração linear do contato do tecido ósseo com a superfície do implante.



b) Fração de Área Ocupada por Osso (BAFO). Área ocupadas por tecido ósseo, entre as duas espiras iniciais do implante na mesial e distal (Figura 10).

Figura 10 - Fração de Área Ocupada por Osso (BAFO), mensuração da área dentro das espiras do implante ocupada por tecido ósseo.



As regiões de interesse das lâminas histológicas foram fotografadas em um aumento de 100x por uma câmera fotográfica (Olympus CAMEDIA C5060/ wide zoom) acoplada ao microscópio óptico (Leica DM2500; Leica Microsystems, Wetzlar, Hessen, Germany). As imagens foram salvas em formato TIFF e analisadas pelo software ImageJ 1.410 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Os dados das mensurações de BIC e BAFO nas faces mesial e distal de cada implante foram obtidos em pixels e convertidos em valores de porcentagem. Cada implante foi usado como réplica biológica. Estes valores de porcentagem foram utilizados para análise estatística.

Estudo 2

Objetivo 1

O objetivo deste estudo foi avaliar qualitativa e quantitativamente o processo de reparo de defeitos ósseos produzidos por Brocas, Ultrassom Cirúrgico e LASER Er,Cr:YSGG, por meio de análise Histológica, Histométrica e Imuno-histoquímica.

Os Materiais e Métodos empregados neste estudo tiveram aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Processo CEEA/FOAr 15/2010). Cento e quarenta e quatro ratos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Holtzman*), machos, adultos, de aproximadamente 3 meses de idade, com massa corporal média de 450 gramas, foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara (FOAr-UNESP) e alimentados com ração sólida e com acesso a água *ad libitum*, antes e durante todo o período experimental, em ambiente com luz, temperatura e higiene controladas, com gaiolas identificadas pelo nome do pesquisador responsável, massa corpórea do animal, data da cirurgia e do sacrifício, conforme o grupo e período, também apontados.

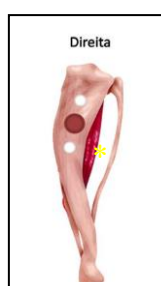
Os animais foram randomicamente divididos, por meio de sorteio, em 3 grupos de 48 animais cada, que foram avaliados em seis diferentes períodos experimentais – zero, 3, 7, 15, 30 e 60 dias com 8 animais em cada período.

Procedimento Cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi realizado nos três grupos como detalhado na metodologia do Estudo 1, no entanto apenas a tíbia direita foi abordada para confecção do defeito ósseo. Para delimitar a região de osteotomia no momento da coleta das peças e da microtomia, dois cones de guta-percha foram inseridos em perfurações feitas por broca

diamantada cônica número 1012 (KG Sorensen – Agerskov, Dinamarca) que distavam 2 milímetros da borda do defeito em sua porção mais central (Figura 11). Os animais foram sacrificados nos períodos de 0, 3, 7, 14, 30 e 60 dias pós-operatórios.

Figura 11 - Desenho esquemático da tíbia direita ilustrando a localização do defeito cirúrgico (*) e as demarcações com guta percha, localizadas a 2 milímetros do defeito.



Coleta das Amostras

Após o sacrifício dos animais, a tíbia direita foi removida com uma margem distando 2mm da marca de guta-percha e fixada em formaldeído a 4% (preparado a partir de paraformaldeído). Após um período de 48 horas de fixação, as peças foram imersas em solução de EDTA a 7% por 60 dias, para descalcificação; e em seguida, cortadas em micrótomo em cortes semi-seriados com 4 μ m de espessura longitudinalmente ao longo eixo da tíbia.

Análises Morfológica e Histomorfométrica

Inicialmente foi realizada a análise morfológica dos cortes obtidos, Nesta análise qualitativa foram avaliadas as características do defeito ósseo criado e do tecido ósseo adjacente à osteotomia, bem como as características do processo de reparo ao longo dos períodos de estudo.

A análise histomorfométrica foi conduzida utilizando-se os dois cortes mais centrais do defeito em um microscópio de luz (Leica DM2500, Leica Microsystems, Wetzlar Hessen,

Alemanha), com aumentos originais de 25 e 100x. Em seguida, imagens representativas foram obtidas por meio de uma câmera fotográfica digital DFC-300-FX (Leica Microsystems, Alemanha), com resolução de 1,3 megapixels, acoplada ao microscópio de luz. As imagens foram analisadas no Software Image J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EUA) para quantificar a neoformação óssea. As avaliações foram realizadas por um único examinador calibrado e cego para os grupos. As mensurações foram feitas em triplicata, em três momentos distintos, com intervalo de uma semana entre cada avaliação observando-se coerência entre as diferentes análises. A porcentagem de osso neoformado foi obtida como descrito a seguir: a área correspondente ao defeito ósseo foi delimitada e denominada Área Total (AT) tendo como base as marcações de guta-percha e as características morfológicas do osso original e neoformado. O valor da AT era atribuído em pixels. Área de neoformação óssea (ANFO) foi então delimitada no interior da AT e também expressa em pixels. A porcentagem de osso neoformado foi calculada como uma fração da AT de acordo com a seguinte fórmula: $(ANFO \times 100) / AT$. Os valores obtidos foram submetidos ao teste de aderência à Curva Normal e homogeneidade de variâncias. Uma vez constatada a normalidade da distribuição amostral, realizou-se o teste one-way ANOVA, seguido por pós teste de Tukey para comparações múltiplas em um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Análise Imunohistoquímica

A análise Imuno-histoquímica foi realizada nas amostras coletadas no sacrifício imediato, 3, 7 e 14 dias pós-operatórios, em três espécimes aleatoriamente escolhidos, para detecção de proteínas ligadas ao processo da neoformação óssea: Osteocalcina (Oc); remodelação óssea: Osteoprotegerina (Opg) e Ligante do Ativador do Receptor do Fator Kappa-B Nuclear (Rankl); angiogênese: Fator de Crescimento Endotelial Vascular (Vegf); e

de apoptose: Caspase-3. Cortes histológicos com 4 μ m de espessura foram aderidos a lâminas silanizadas (DAKO A/S, Golstrup, Dinamarca) seguindo-se a tramitação laboratorial de rotina para desparafinização e reidratação. A recuperação antigênica para detecção Oc, Opg e Rankl foi realizada por meio da incubação das lâminas em solução de tripsina 0.5% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) por 20 minutos a 37° C e resfriadas à temperatura ambiente. As lâminas selecionadas para marcação de Vegf e Caspase-3 foram imersas em solução de citrato de sódio 10mM em pH 6.0 a 70-75°C por 30 minutos em panela de pressão. Para o bloqueio da peroxidase endógena, todos os cortes foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio 3% (LabSynth, Diadema, Brasil) por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com solução de Albumina de Soro Bovino 3% (Bovine Serum Albumin-BSA) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) em temperatura ambiente para o bloqueio de ligações inespecíficas. Os cortes foram então incubados *overnight* com anticorpos primários específicos para Oc (Anticorpo Policlonal de Camundongo – Abcam, Inc. USA, catálogo ab13420, diluição 1:200), Opg (Anticorpo Policlonal de Coelho – Abcam, Inc. USA, catálogo ab73400, diluição 1:300), Rankl (Anticorpo Policlonal de Camundongo – Santa Cruz Biotechnology Inc., USA, catálogo sc-7628, diluição 1:200), Vegf (Anticorpo Policlonal de Coelho – Abcam, Inc. USA, catálogo ab46154, dilution 1:400) e Caspase-3 (Anticorpo Policlonal de Coelho – Abcam, Inc. USA, catálogo ab44976, diluição 1:400). Como controle negativo, os anticorpos primários foram omitidos em cortes específicos para cada anticorpo. Após sucessivas lavagens, os cortes foram incubados com anticorpos secundários do (Universal LSAB 2 Kit/HRP Kit DAKO Inc., USA) segundo as instruções do fabricante e o produto da reação foi detectado pelo complexo Avidina-Biotina-Peroxidase e corado com o cromógeno diaminobenzidina (Liquid DAB+Substrate Chromogen System - DAKO, USA). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris e examinados por um examinador calibrado e cego para os grupos experimentais, utilizando os mesmo equipamentos da análise

morfológica em aumentos de 25x a 100x. A quantificação da expressão das proteínas foi realizada por uma análise quantitativa ordinal seguindo metodologia previamente descrita^{20,21}. Brevemente: os escores foram categorizados como negativo (-), positivo (+), superpositivo (++) e hiperpositivo (+++). Para executar a comparação quantitativa os escores foram convertidos em percentis: 0% (equivalente ao escore negativo -), 20% (equivalente ao escore positivo + e 10 a 30 % de intensidade total de coloração), 60% (equivalente ao escore superpositivo ++ e 50 a 70 % de intensidade total de coloração) e 90% (equivalente ao escore hipersuperpositivo +++ e 80 a 100 % de intensidade total de coloração). As médias dos percentis de cada proteína foram submetidas ao teste de aderência à Curva Normal e homogeneidade de variâncias. Como não foi constatada a normalidade da distribuição amostral, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas dos diferentes períodos em ambos os grupos, considerando-se o nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Estudo 2

Objetivo 2

Avaliar possíveis diferenças na expressão de fatores de crescimento e/ou proteínas osteogênicas durante o reparo de osteotomias produzidas por Ultrassom Cirúrgico.

Para a execução deste trabalho foram utilizados 30 ratos *Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Holtzman, machos, adultos, de aproximadamente 3 meses de idade, com massa corporal média de 300 gramas, mantidos com ração sólida e com acesso a água *ad libitum*, antes e durante todo o período experimental, em ambiente com luz, temperatura e higiene controladas, sendo que suas gaiolas foram identificadas pelo nome do pesquisador responsável, massa corpórea do animal, data da cirurgia e do sacrifício, conforme o grupo e período, também apontados.

Os animais foram randomicamente divididos, por meio de sorteio, em 2 grupos de 15 animais cada, que foram avaliados em três diferentes períodos experimentais – 3, 7 e 14 dias - com 5 animais em cada período.

Procedimento Cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi realizado nos dois grupos como detalhado na metodologia do Estudo 1 para os Grupos Broca e Piezo. A delimitação do defeito com guta-percha também foi realizada nos espécimes deste experimento com margem de 2mm a partir das bordas centrais do defeito conforme detalhado na metodologia do Estudo 2, objetivo 1. (Figura 12). A sutura, medicação e cuidados pós-operatórios também foram feitos como descrito nas metodologias já descritas.

Figura 12 - Desenho esquemático da tíbia direita ilustrando a localização do defeito cirúrgico (*).



Coleta das Amostras

Após o sacrifício dos animais aos 3, 7 e 14 dias, as tíbias direitas contendo a osteotomia, tiveram o tecido mole removido e foram reduzidas a um bloco ósseo que compreendia o defeito com uma margem de 2mm. Os blocos ósseos foram imediatamente lavados com solução de PBS e imersos em solução de RNA Later (Sigma-Aldrich Inc. Brasil) em tubos identificados, onde permaneceram *overnight* em ambiente refrigerado a 4°C para serem posteriormente armazenados em freezer -80°C até o momento da extração do RNA.

A extração do RNA foi realizada com trizol (Life Technologies Inc, USA) de acordo com protocolo do fabricante. Uma vez extraído o RNA, procedeu-se à síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa a partir de 1µg de RNA total usando Kit específico para este fim (High Capacity cDNA synthesis kit, Applied Biosystems, Warrington, UK). A Reação em Cadeia de Polimerase foi realizada sob condições controladas de ciclo e reagentes enzimáticos por meio do sistema StepOne (Life Technologies Inc, USA) usando primers e sondas específicos para cada gene alvo (Universal Probe Library - Roche, Indianapois, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As reações para cada gene-alvo foram feitas em triplicatas de 10µl contendo cDNA + substratos. Os dados foram analisados

usando o método comparativo $\Delta\Delta Ct$. Vinte e um genes, divididos em cinco categorias foram testados. A saber:

1) Via de sinalização Bmp: Proteína Óssea Morfogenética 2 (Bmp2, NM_017178.1), Proteína Óssea Morfogenética 4 (Bmp4, NM_012827.2), Runt related transcription factor 2 (Runx2, NM_053470.2), Noggin (Noggin, NM_012990.1), Chordin (Chordin, NM_057134.1).

2) Via de Sinalização Wnt: Wingless-related MMTV integration site 5A (Wnt5a, NM_022631.1), Wingless-related MMTV integration site 10B (Wnt10b, NM_01108111.1), Lymphoid enhancer binding factor 1 (Lef-1, NM_NM_130429.1), Esclerotina (Sclerostin, NM_030584.1), Inibidor da Via de Sinalização Dickkopf Wnt (Dkk1, NM_001106350.1).

3) Marcadores Osteogênicos: Colágeno Tipo I alfa (Col1 α , NM_053304.1), Osteocalcina (Oc, NM_013414.1), Fosfatase Alcalina (Alpl, NM_013059.1), Osteoprotegerina (Opg, NM_U94330.1).

4) Citocinas Inflamatórias e Apoptose: Interleucina 1 β (IL-1 β , NM_031512.2), Interleucina 6 (IL-6, NM_012589.1), Fator de Necrose Tumoral Alfa (Tnf-1 α , NM_012675.3) e Caspase-3 (Cas-3, NM_012922.2).

5) Fatores de Crescimento: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (Pdgf, NM_031524.1), Fator de Crescimento Transformador Beta 1 (Tgf- β 1, NM_021578.2) e Fator de Crescimento Endotelial Vascular (Vegf, NM_001110333.1).

Os valores de expressão de cada gene do Grupo Piezo foram calculados como expressão relativa comparada ao Grupo Broca. A análise estatística foi executada pelo teste t de Student com nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Apêndice 2

Resultados Adicionais

Estudo 2 – Análise histomorfológica e histomorfométrica

Figura 1 - Fotomicrografias do processo de reparo dos defeitos ósseos dos Grupos Broca, Piezo e Laser obtidas aos zero, 3, 7, 14, 30 e 60 dias pós-operatórios. Hematoxilina & Eosina. Aumento 200x.

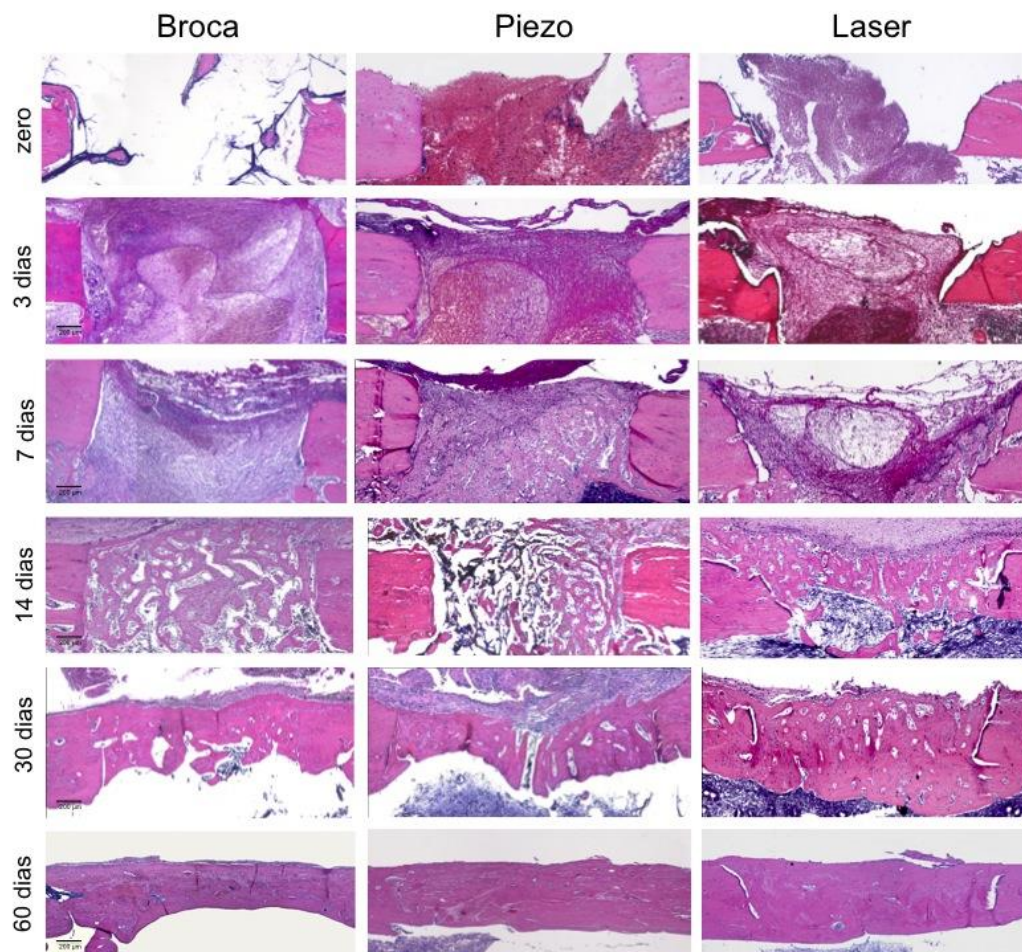
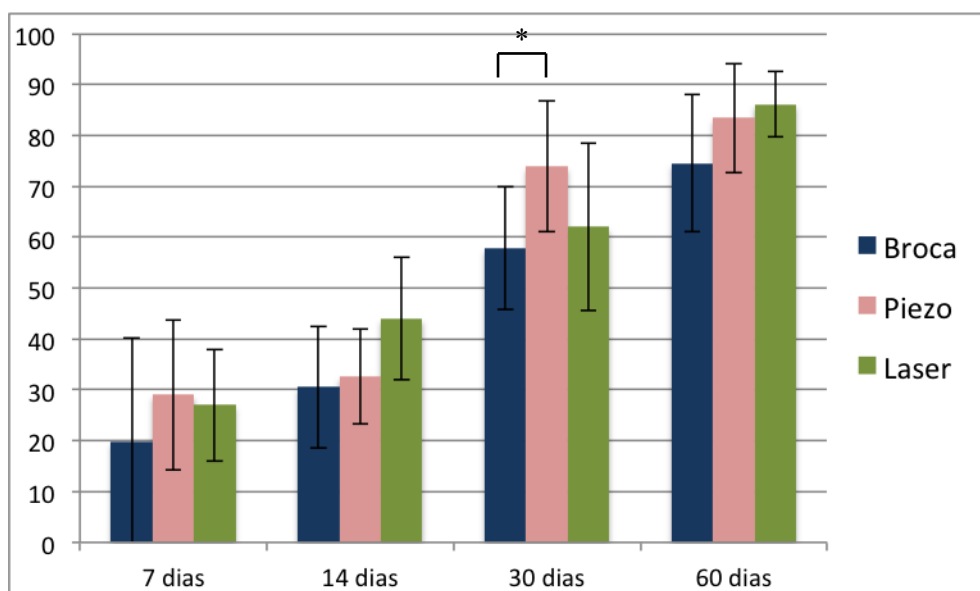


Figura 2 - Representação gráfica da porcentagem média de neoformação óssea dos Grupos Broca, Piezo e Laser ao longo dos períodos de estud. A análise estatística demonstrou diferença significante entre os Grupos Piezo e Broca aos 30 dias ($p<0.05$).



Estudo 2 – Análise Imuno-histoquímica

Figura 3 - Média \pm Desvio Padrão e comparação estatística (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Tukey) dos percentis da imunomarcação para detecção de Osteocalcina (Oc), Osteoprotegerina (Opg), Rankl, Vegf e Caspase 3 (Cas-3) aos 3, 7 e 14 dias nos Grupos Broca, Piezo e Laser. **Oc**: * $p < 0.05$ relativo a 3 dias, # $p < 0.05$ relativo a 3 dias, † $p < 0.05$ relativo a 7 dias; **Vegf** * $p < 0.05$ relativo a 3 dias; **Cas-3** † $p < 0.05$ entre os grupos Broca e Laser aos 7 dias, # $p < 0.05$ relativo a 3 dias, * $p < 0.05$ relativo a 7 dias.

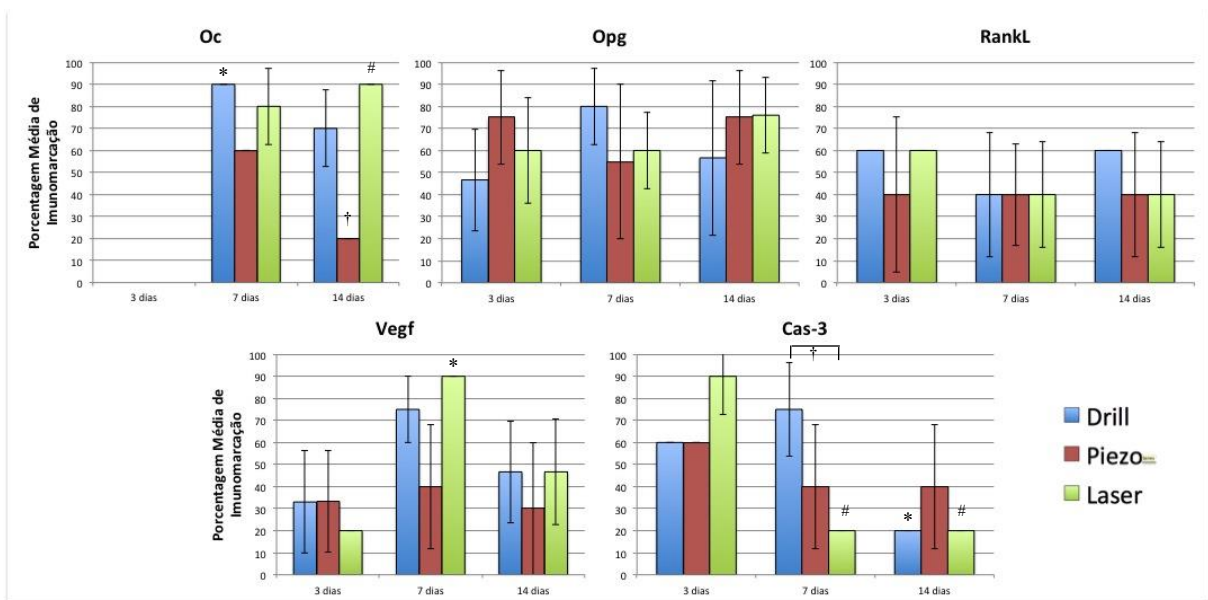


Figura 4 - Fotomicrografias de porções dos defeitos ósseos produzidos por Broca, Ultrassom Cirúrgico ou Laser Er,Cr:YSGG aos 7 e 14 pós-operatórios. Imuno-histoquímica para detecção de Osteocalcina (marrom), contra-corada por Hematoxilina. Aos 7 dias a marcação hiperpositiva é observada no osso neoformado e especialmente na faixa de osteoblastos ao redor do tecido osteóide em ambos os grupos. Porém a imunomarcação nos Grupos Broca e Laser apresenta-se mais intensas comparados ao Grupo Piezo. Aos 14 dias observa-se imunomarcação hiperpositiva no Grupo Laser, Positiva no Grupo Piezo e Superpositiva no Grupo Broca. Barra 100µm.

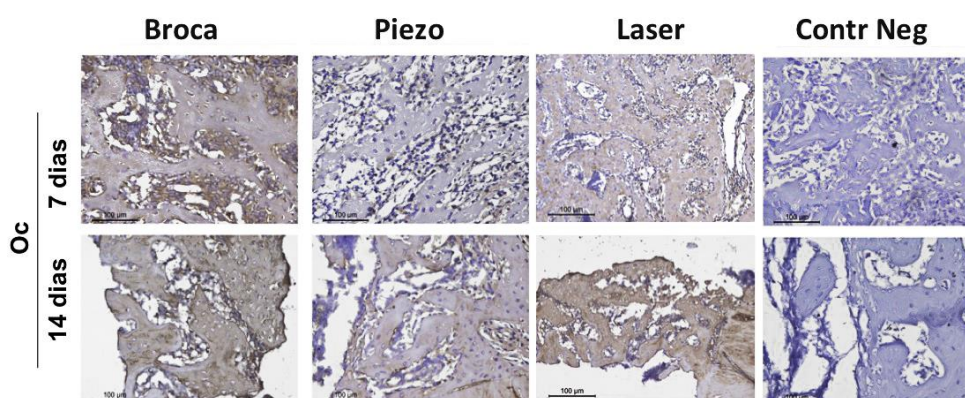


Figura 5 - Fotomicrografia de porções de defeitos ósseos produzidos por Broca, Ultrassom Cirúrgico ou LASER Er,Cr:YSGG analisadas aos 3, 7 e 14 dias pós-operatórios. Imuno-histoquímica para detecção de Opg e Rankl (marrom) contra-coradas por hematoxilina. **Opg**: Aos 3 dias uma imunomarcação hiperpositiva é observada no Grupo Piezo e superpositiva nos Grupos Broca e Laser. Aos 7 dias a intensidade de marcação no Grupo Broca é hiperpositiva e mais intensa do que a dos Grupos Piezo e Laser, que apresentam intensidade superpositiva. Tanto a matriz óssea neoformada quanto a linha periférica de osteócitos/osteoclastos apresentam positividade para Opg neste período. Aos 14 dias a intensidade da imunomarcação nos Grupos Laser e Piezo é hiperpositiva, com coloração mais

intensa que o Grupo Broca no mesmo período (superpositivo). **Rankl**: Imunomarcção superpositiva aos 3 dias no Grupo Broca e Laser com intensidade ligeiramente menor no Grupo Piezo. Aos 7 dias os três grupos apresentaram intensidade semelhante na expressão de Rankl. Aos 14 dias, a marcação distribuía-se especialmente no periosteio e nos espaços intertrabeculares com intensidade Superpositiva no Grupo Broca e positiva nos Grupos Piezo e Laser. Barra 100µm

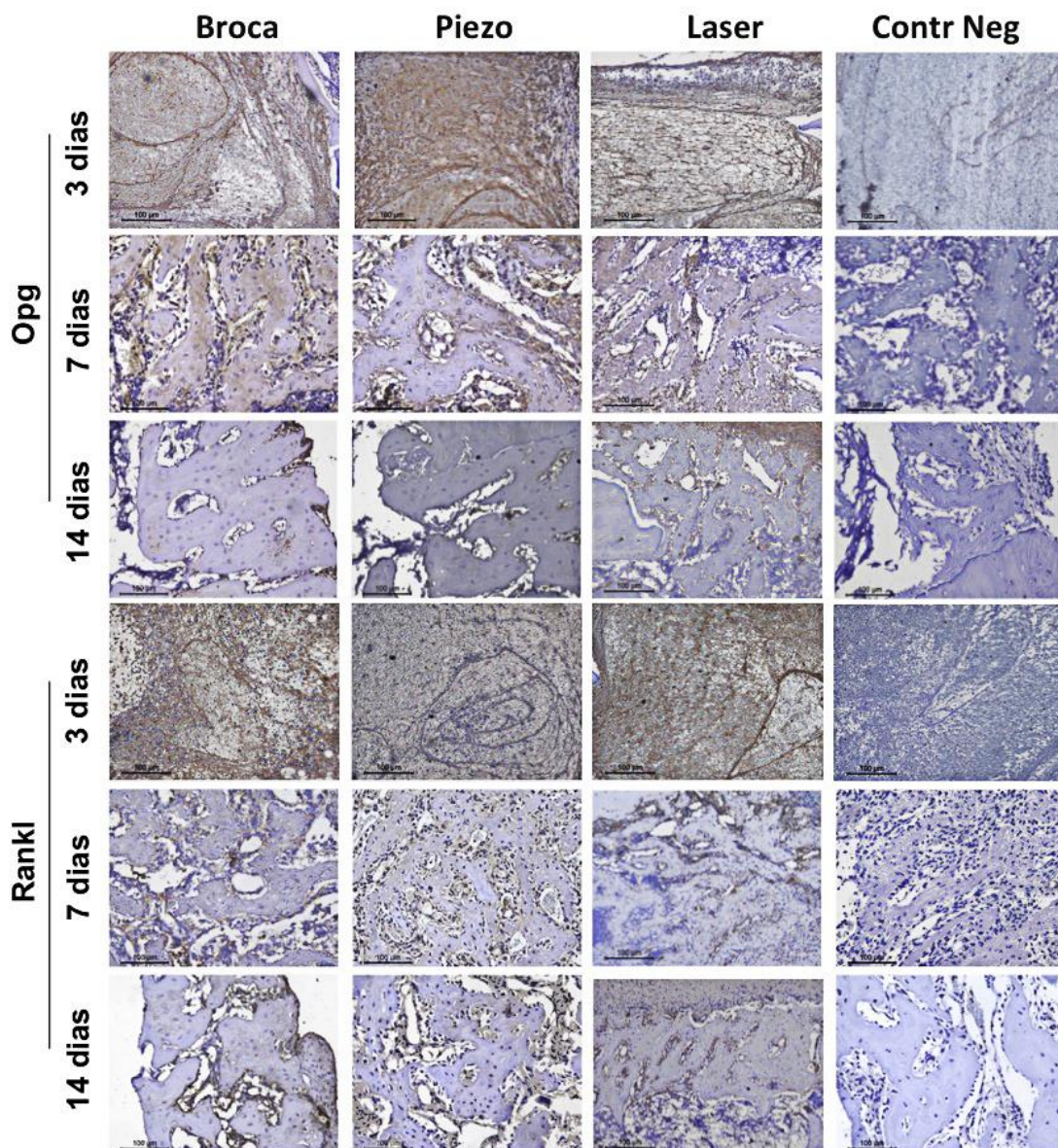


Figura 6 - Fotomicrografia de porções de defeitos ósseos produzidos por Broca, Ultrassom Cirúrgico ou Laser Er,Cr:YSGG analisadas aos 3, 7 e 14 dias pós-operatórios. Imuno-histoquímica para detecção de Vegf e Caspase-3 (marrom) contra-coradas por hematoxilina.

Vegf: Aos 3 dias a imunomarcação positiva nos três grupos é observada no coágulo sanguíneo e é ligeiramente mais intensa nos Grupo Broca e Piezo. Aos 7 dias, Observa-se um aumento na intensidade da expressão de Vegf no grupos Broca e Laser com marcação hiperpositiva, superpositiva e positiva para os Grupos Laser, Broca e Piezo, respectivamente. Neste período, a expressão de Vegf é localizada no tecido conjuntivo, especialmente ao redor de vasos sanguíneos. Aos 14 dias a expressão é diminuída em todos os grupos atingindo intensidade próxima a superpositiva nos Grupos Broca e Laser, e positiva no Grupo Piezo. **Caspase-3:** A intensidade de marcação de caspase-3 aos 3 dias é maior no Grupo Laser (hiperpositiva) comparada aos Grupos Broca e Piezo (Superpositiva). Aos 7 dias, os três grupos assumem intensidades distintas na marcação de caspase-3, onde o Grupo Laser apresenta o mais elevado nível de expressão (hiperpositiva) seguido pelo Grupo Piezo (superpositiva) e pelo Grupo Broca (positiva). Já aos 14 dias a expressão de Caspase 3 é reduzida em todos os grupos, no entanto, o Grupo Piezo ainda apresenta intensidade mais elevada de marcação com para Caspase-3. Barra 100µm.

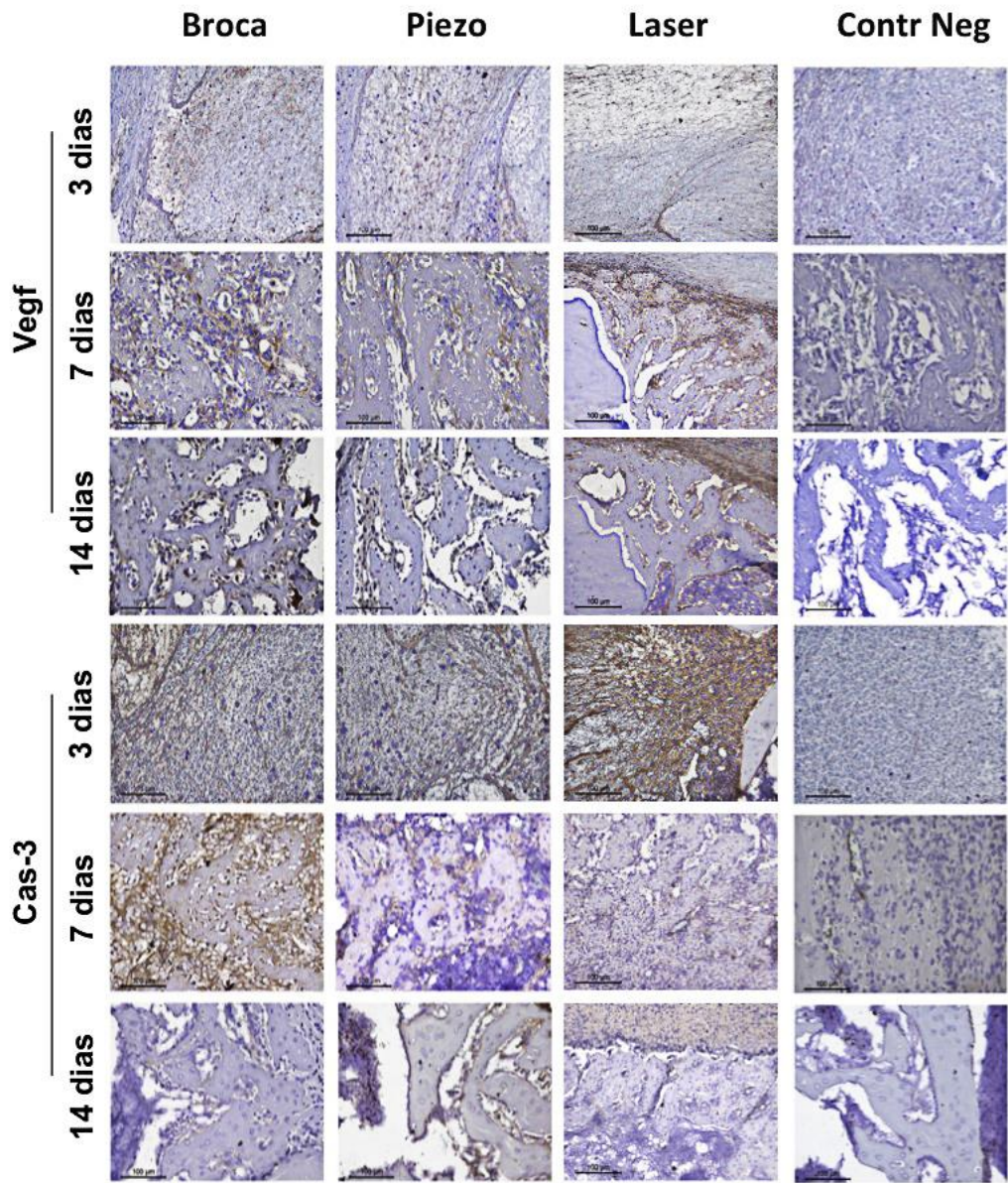
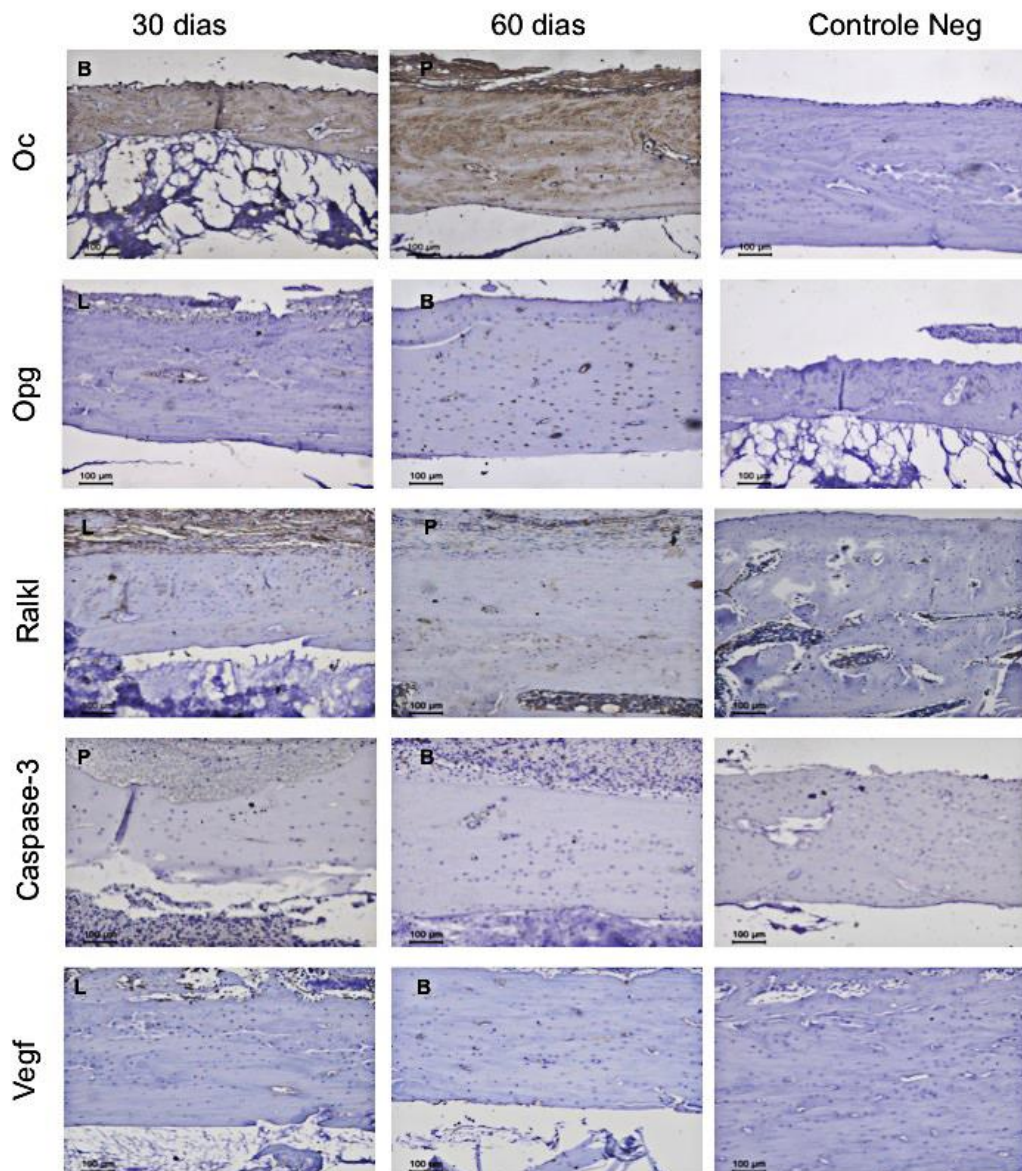



Figura 7 - Fotomicrografia de porções dos defeitos ósseos produzidos pelos dispositivos testados em períodos tardios do processo de reparo (30 e 60 dias) preenchidos por osso neoformado. Nestes períodos, não foram observadas diferenças no nível de expressão entre os grupos de nenhuma das proteínas estudadas. A imunomarcação de Oc, Rankl e Vegf concentrava-se no osso neoformado e no periósteo, enquanto a imunomarcação de Vegf concentrava-se no periósteo e tecidos inter-trabeculares, quando presente. A expressão de caspase-3 era praticamente imperceptível aos 30 e 60 dias. (B, P e L: Cortes histológicos dos Grupos Broca, Piezo e Laser, Respectivamente).




7 Anexos

Anexo A

Comitê de Ética

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEEA nº 15/2010


pl jmar ton

Araraquara, 05 de julho de 2010

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em 05/07/2010, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Reparo ósseo ao redor de implantes instalados em alvéolos cirúrgicos preparados por meio de fresas, ultrassom piezoelétrico e laser Er,Cr:YSGG – estudo radiográfico, biomecânico, histomorfométrico e imunohistoquímico em ratos" (Proc. CEEA nº 15/2010) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para DEZEMBRO/2012.

Atenciosamente.


Profª Drª ELENY ZANELLA BALDUCCI
Coordenadora do CEEA

Ao
Prof. Dr. ÉLCIO MARCANTONIO JUNIOR
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA
Rua Humaitá nº 1.680 - Centro - CEP 14801-903 - Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA - SP
5º andar - fone (16) 3301-6431/6432 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: diretor@four.unesp.br - home page: <http://www.four.unesp.br>

Não autorizo a publicação deste trabalho até 14 de março de 2017

Araraquara, 14 de Março de 2014

Jônatas Caldeira Esteves