



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

LETÍCIA CAVASSINI TORQUATO

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS DE
TAMANHO CRÍTICO TRATADOS COM MATRIZ ÓSSEA
MINERALIZADA DE OSSO BOVINO (BIO-OSS®) E LASER
DE BAIXA INTENSIDADE. ESTUDO
HISTOMORFOMÉTRICO E IMUNOHISTOQUÍMICO EM
RATOS**

LETÍCIA CAVASSINI TORQUATO

AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS DE TAMANHO CRÍTICO TRATADOS COM MATRIZ ÓSSEA MINERALIZADA DE OSSO BOVINO (BIO-OSS®) E LASER DE BAIXA INTENSIDADE. ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO E IMUNOHISTOQUÍMICO EM RATOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Periodontia. Linha de pesquisa: Estudos sobre microbiologia, imunologia e terapia em periodontia e implantodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Carvalho De Marco

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Torquato, Leticia Cavassini

Avaliação do reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com matriz óssea mineralizada de osso bovino (Bio-Oss®) e laser de baixa intensidade. Estudo histomorfométrico e imunohistoquímico em ratos / Leticia Cavassini Torquato. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.
67 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2020.

Orientadora: Andréa Carvalho De Marco.

1. Materiais biocompatíveis. 2. Regeneração óssea. 3. Transplante ósseo. 4. Lasers. 5. Imuno-histoquímica. I. De Marco, Andréa Carvalho, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Andréa Carvalho De Marco

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Maria Aparecida Neves Jardim

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Milton Santamaria Júnior

Uniararas

Fundação Hermínio Ometto – FHO

Campus de Araras

São José dos Campos, 20 de fevereiro de 2020.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cleide Cavassini Torquato e Claudinei Henrique Torquato por toda dedicação, apoio e carinho. Vocês são meus exemplos de garra e superação, não há forma de agradecer por todos os sacrifícios que fizeram e fazem por mim, obrigado por me guiarem nesses anos, devo tudo a vocês.

Aos meus avós paternos, Maria Luiza Batista Torquato e Lazaro Aparecido Torquato (*in memoriam*) por sempre me verem com orgulho. À minha avó materna, Margarida Frizo Cavassini por ser meu exemplo de pessoa de fé e amor.

À minha irmã Rafaela, que a sua maneira tem me apoiado em todas as decisões que venho tomando durante meu caminho e sempre estando presente em momentos difíceis.

Ao meu namorado, Juliano Kazuto Chiba por toda paciência, dedicação e amor em ajudar a superar os meus obstáculos diários, tenho grande admiração pela sua força e determinação.

À Deus, por ter me abençoado colocando pessoas maravilhosas em meu caminho que me ajudam a crescer diariamente.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Ciência e Tecnologia - Unesp, na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Dra. Rebeca Di Nicoló e do vice-diretor Prof.Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Prof. Assoc. Luciane Dias de Oliveira.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, Profa. Dra. Andréa Carvalho De Marco, Prof. Dra. Maria Aparecida Neves Jardini, Prof. Dr. Mauro Pedrine Santamaria e o Prof. Dr. Sérgio Lúcio P. de Castro Lopes.

Aos meus amigos da Pós-graduação, pelo companheirismo e ajuda diária.

À Daniela Vicensotto Bernardo, Eduardo Antônio Chelin Suarez, Isis Luzcybel Ribeiro Pinto, Ludmilla Oliveira Mantovani e Tiago Igor Lemes Silva por participarem ativamente deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado no período de 01/11/2018 à 01/03/2020.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão do Auxílio de Pesquisa, sob o número de processo: 420170/2016-2, e que possibilitou a realização deste projeto.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica aos estudantes de Ensino Médio (PIBIC Jr), pela concessão de bolsa primeiramente ao Tiago Igor Lemes Silva nos anos de 2017-2018, e em seguida para a aluna Ludmilla Oliveira Mantovani em 2019.

À equipe técnica da clínica, Jacqueline Amaral Gomes Bueno, Marcia Cristina Lopes Garcia e Valeria Santos da Silva, pela ajuda e dedicação de sempre. Ao Walter Cruz por toda assistência dada durante o processo laboratorial deste trabalho.

À minha orientadora Prof. Dra. Andréa Carvalho De Marco pela dedicação, disposição, companheirismo, respeito e exemplo de profissional nesses dois anos de trabalho.

*“Só podemos medir a nossa força quando nos deparamos com um
obstáculo”*

Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	16
2.1 Objetivo geral	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Desenho do estudo	17
3.2 Procedimento cirúrgico	19
3.2.1 Modalidades de tratamento	20
3.3 Processamento histológico.....	22
3.3.1 Histomorfometria	23
3.3.2 Reações de imunohistoquímica	27
3.4 Análise estatística	29
4 RESULTADO	30
4.1 Análise histológica descritiva	30
4.1.1 Análise histomorfométrica	40
4.2 Análise imunohistoquímica	44
5 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXO	66

Torquato LC. Avaliação do reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com matriz óssea mineralizada de osso bovino (Bio-Oss®) e laser de baixa intensidade. Estudo histomorfométrico e imunohistoquímico em ratos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) associada ao Bio-Oss® em defeitos de tamanho crítico de ratos. Foram utilizados 72 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar), com 90 dias de idade. Foram realizados defeitos ósseos na calvária com 5 mm de diâmetro. Os animais foram divididos em 4 grupos: C-Coágulo sanguíneo, B- Bio-Oss®, L- LLLT, B+L- Bio-Oss® + LLLT. Cada grupo foi subdividido de acordo com os períodos de observação de 07, 30 e 60 dias, com 6 ratos em cada subgrupo. Para LLLT uma baixa energia GaAlAs com comprimento de onda de 660 nm, foi aplicada em 5 pontos. Foram distribuídos 4 pontos de aplicação ao longo das bordas da ferida e um ponto de aplicação localizado na região central da ferida cirúrgica. A irradiação foi liberada por 12 segundos por ponto, com uma densidade total de energia de 45 J/cm². A irradiação com laser ocorreu de forma transcirúrgica em única aplicação imediatamente após o procedimento. Em 07, 30 e em 60 dias, 6 animais de cada grupo foram eutanasiados pela aplicação de anestesia geral em dose triplicada, e após os testes de sensibilidade os animais foram decapitados. Em seguida a calvária foi removida para análises histomorfométrica e imunohistoquímica. Todos os dados histomorfométricos foram submetidos a análise por ANOVA, complementado pelo teste de Tukey. O nível de significância foi de 5%. Os resultados da imunohistoquímica foram representados por *scores* e porcentagem. Os grupos que apresentaram maior proporção de neoformação foram os grupos L (0,39±0,13) e C (0,37±0,97), porém os grupos B e B+L tiveram maior tamanho de defeito (C-1,75±0,40, B-3,02±0,63, L-2,45±0,53, B+L-3,23±1,01). Na imunohistoquímica, aos 60 dias, os grupos B (*score* 4-34%) e B+L (B+L *score* 4-50%) apresentaram maior *scores* de imunomarcção para OPG e RANKL, aos 30 dias a porcentagem de imunomarcção para TRAP aumentou em todos os grupos, sendo o L o único a apresentar espécimes com *score* 0 (16%). Os grupos que apresentaram maior proporção de neoformação foram os grupos L e C, no entanto, os maiores valores relacionados ao volume ósseo foram encontrados nos grupos B e B+L.

Todos os grupos apresentaram menores valores referente a distância entre as bordas de osso neoformado no interior do defeito ao final do experimento. Os grupos B e B+L apresentaram os maiores *scores* de imunomarcção para OPG, as imunomarcações para TRAP apareceram mais tardiamente no grupo L.

Palavras-chave: Materiais biocompatíveis. Regeneração óssea. Transplante ósseo. Lasers. Imuno-histoquímica.

Torquato LC. Assessment of bone repair of critical size defects treated with bovine bone mineral matrix (BioOss®) and low-level laser therapy: histomorphometric and immunohistochemical study in rats [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2020.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of low-level laser therapy (LLLT) associated with Bio-Oss® on critical size defects in rats. 72 adult male rats (*Rattus norvegicus*, variation *albinus*, Wistar), 90 days old, were used. Bone defects were made in the calvaria with a diameter of 5 mm. The animals were divided into 4 groups: C-blood clot, B-Bio-Oss®, L-LLLT, B + L- Bio-Oss® + LLLT. Each group was subdivided according to the observation periods of 07, 30 and 60 days, with 6 rats in each subgroup. For LLLT a low GaAlAs energy with a wavelength of 660 nm was applied at 5 points. 4 points of application were distributed along the edges of the wound and one point of application located in the central region of the surgical wound. The irradiation was released for 12 seconds per point, with a total energy density of 45 J/cm². Laser irradiation occurred in a trans-surgical form in a single application immediately after the procedure. At 07, 30 and 60 days, 6 animals from each group were euthanized by applying triple dose of general anesthesia, after the sensitivity tests the animals were beheaded. Then the calvaria was removed for histomorphometric and immunohistochemistry analysis. All histomorphometric data were analyzed statistically by ANOVA, complemented by the Tukey test. The level of significance was 5%. The results of immunohistochemistry were represented by scores and percentage. The groups that showed the highest proportion of neoformation were groups L (0,39±0,13) and C (0,37±0,97), but groups B and B + L had a larger defect size (C-1,75±0,40, B-3,02±0,63, L-2,45±0,53, B+L-3,23±1,01). In immunohistochemistry, at 60 days, groups B (score 4- 34%) and B + L (B+L score 4 - 50%) had higher immunostaining scores for OPG and RANKL, at 30 days the percentage of immunomarking for TRAP increased in all groups, group L was the only one to present specimens with a score 0 (16%). The groups with the highest proportion of neoformation were groups L and C, however, the highest values related to bone volume were found in groups B and B+L. All groups had lower values regarding the distance between the edges of newly formed bone inside the defect at the end of the experiment. Groups B and B+L had the highest immunostaining scores for

OPG, immunomarkings for TRAP appear later in group L.

Keywords: Biocompatible materials. Bone regeneration. Bone transplantation. Lasers. Immunohistochemistry.

1 INTRODUÇÃO

O osso autógeno é reconhecido como o padrão-ouro para o enxerto ósseo, fornecendo células osteogênicas, matriz extracelular, e sinais moleculares para a indução e diferenciação óssea (Springfield, 1992; Khouri et al., 1996). As vantagens dos enxertos autógenos são: osteocondução, osteoindução e efeitos osteogênicos que promovem elevado potencial regenerativo (Klijn et al., 2010). Porém, a remoção de enxertos autógenos implica em um segundo sítio cirúrgico doador e aumenta a morbidade do paciente (Chaushu et al., 2009; Sbordone et al., 2009). Além de complicações que podem ocorrer quando um sítio doador intraoral for eleito como: danos aos nervos alveolar e mentoniano, desvitalização de dentes em áreas adjacentes ao campo operatório, comprometimento da estética facial, aumento do risco de fraturas mandibulares dependendo do sítio doador (Galindo-Moreno et al., 2007; Schmitt et al., 2013).

Diante destas questões, hoje em dia, uma variedade de materiais substitutos ósseos vem sendo demonstrada clinicamente para promover resultados aceitáveis (Stavropoulos et al., 2003; Iezzi et al., 2008; Klijn et al., 2010). O ideal é que os materiais substitutos ósseos possuam boa integração óssea, osteoindução e estabilidade a longo prazo. No entanto, tal material substituto ósseo, na sua forma pura, ainda não existe (Schmitt et al., 2013). Mokbel et al. (2008) em seu estudo com ratos comparando o padrão de reparação óssea entre diferentes tipos de enxertos concluíram que apesar do osso autógeno se demonstrar superior, quando comparado aos substitutos ósseos o mesmo padrão de reparação e propriedades de osteocondutividade foram encontradas.

Shamsoddin et al. (2019), afirmaram que após os enxertos autógenos, pode-se introduzir o Bio-Oss® (Geistlich Biomaterials GmbH) como o biomaterial xenógeno mais confiável e amplamente utilizado dos materiais de enxerto em odontologia, isso se deve pelo material promover uma formação óssea previsível, sustentável e adequada com menores taxas de infecção. O Bio-Oss® caracteriza-se por ser uma matriz óssea mineral porosa de osso bovino cortical ou esponjoso (Stavropoulos et al., 2003; Iezzi et al., 2008). Devido a sua estrutura natural, Bio-Oss® é física e quimicamente comparado a matriz mineralizada de osso humano. A matriz orgânica de Bio-Oss® contém estruturas macroscópicas e microscópicas com um sistema de poros interconectados que serve como um “*scaffold*” para a migração de células osteogênicas (Tapety et al., 2004). Essa estrutura física permite rápida estabilização do coágulo e revascularização (Stavropoulos et al., 2003; Iezzi et al., 2008).

O Bio-Oss® é conhecido como um substituto ósseo não reabsorvível (Schlegel et al., 1998; Schlegel et al., 2006), porém, após seis semanas de sua implantação é possível observar ao redor das partículas de forma concentrada a presença de células positivas para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), uma proteína ligada aos osteoclastos que desempenham um papel significativo no processo de remodelagem óssea (Fan et al., 2018). Estudos confirmaram as propriedades superiores de biocompatibilidade e osteocondução do Bio-Oss® quando comparado com outros substitutos ósseos (Stavropoulos et al., 2003; Iezzi et al., 2008).

De maneira similar, existem evidências demonstrando que a terapia com laser de baixa intensidades (LLLT) tem um efeito positivo no metabolismo do tecido ósseo, e na consolidação de fraturas (Pinheiro et al., 2006; Renno et al., 2010). Estudos *in vitro*, com células osteoblásticas mostraram que a LLLT é capaz de aumentar a atividade mitocondrial (Oliveira et al., 2010), a formação de

nódulos de calcificação (Stein et al., 2005), a expressão gênica de osteocalcina e osteopontina e atividade de fosfatase alcalina (Yaoita et al., 2000; Renno et al., 2010). A terapia com LLLT também demonstrou habilidade em acelerar o processo de reparação de fraturas em coelhos e ratos, aumentar o volume do “callus” e a densidade mineral óssea (Matsumoto et al., 2009). Nunes et al. (2019) demonstraram o potencial da LLLT na regulação do metabolismo ósseo em ratos, sob efeito do tabagismo. Os animais tratados com fotobiomodulação apresentaram um número menor de células positivas para TRAP em relação aos animais do grupo fumante não tratados, o que acabou resultando em um melhor processo de reparo tecidual.

A luz laser, particularmente a de baixa intensidade, 660 nm, pode desempenhar um papel positivo na reparação de defeitos ósseos. Alguns autores afirmam que a LLLT pode acelerar a formação óssea pelo aumento da atividade osteoblástica, da vascularização; promovendo organização de fibras colágenas, elevando níveis de ATP, ativando sistema linfático, a proliferação de células epiteliais e fibroblastos; e aumentando a síntese de colágeno pelos fibroblastos (Trelles e Mayayo, 1987; Garavello-Freitas et al., 2003). Em tecidos duros, a terapia com laser de baixa intensidade aumenta significativamente o número de osteócitos viáveis no osso irradiado, causando um efeito positivo na produção de matriz óssea para que o tecido ósseo ao redor dos enxertos ou na região periférica dos defeitos, seja altamente reativo e vital (Dörtbudak et al., 2002). Além disso, a irradiação com laser promove um aumento na sinalização de osteoprotegerina (OPG) e do ativador receptor do ligante fator kappa-B nuclear (RANKL). Esse aumento de OPG inibe a maturação dos osteoclastos, promovendo maior formação óssea nos períodos iniciais de remodelação óssea, sendo que nos estágios finais, os níveis de RANKL tendem a aumentar consideravelmente (Rasouli et al., 2014).

A LLLT também tem demonstrado ser efetiva no processo de reparação óssea em cavidades ósseas criadas artificialmente (Nissan et al., 2006). Sella et al. (2015) em seu estudo em ratos com defeitos ósseos e aplicações diárias de laser durante 8 dias confirmaram os efeitos benéficos da LLLT no reparo da fratura, não apenas na redução da fase inflamatória, mas também na intensificação da fase reparadora.

Porém a LLLT tem apresentado resultados positivos também em aplicação única e transoperatória, Pretel et al. (2017) demonstraram como uma única aplicação de laser GaAlAs, de 780nm e uma dose total de 178J/cm², durante o processo cirúrgico pode abreviar o tempo de reparação óssea através da estimulação da modulação da resposta inflamatória inicial. De forma semelhante, Cunha et al. (2014) aplicando uma dose única transoperatória de uma baixa energia de GaAlAs, de 780 nm e 210 J/cm² de densidade de energia, concluíram que a LLLT acelerou a cicatrização de defeitos ósseos e a reabsorção das partículas do material do enxerto.

Entretanto, pequena atenção tem sido dada ao efeito da associação de substitutos ósseos com terapia com laser de baixa intensidade em animais. Muniz Renno et al. (2006), demonstraram que a terapia com laser de baixa intensidade teve um efeito positivo na osteogênese de ratos osteopênicos, aumentando a força femoral, o conteúdo de cálcio e a densidade óssea. De Almeida et al. (2018) concluíram que a utilização da LLLT pode atenuar o efeito prejudicial da nicotina que dificulta a formação óssea na interface preparo-enxerto. Além disso, Diniz et al. (2009), demonstraram que a associação de bifosfonatos e a terapia com laser de baixa potência também pode aumentar o volume do trabeculado ósseo em vertebrae no grupo controle osteopênico. Fangel et al. (2011), também demonstraram bons resultados indicando que a terapia com laser quando associada ao Biosilicato® melhora o processo de

reparação óssea resultando em aumento da formação óssea tanto quanto das propriedades biomecânicas. De Oliveira et al. (2018) utilizando aloenxertos e xenoenxertos concluíram que o uso de LLLT estimulou a reparação e a formação de tecido ósseo em áreas não enxertadas, e que este efeito foi associado com a maior expressão de proteínas e genes relacionados à atividade e diferenciação osteoblástica, particularmente nos primeiros períodos de reparação.

A associação de LLLT com Bio-Oss® já foi mostrada em estudo anterior, Rasouli et al. (2014) estudaram a associação dessas modalidades terapêuticas em defeitos de calvária em coelhos e concluíram a aplicação de LLLT com laser de diodo (810nm, ED: 4 J/cm²) pode promover a reparação óssea, porém, o efeito da fotobiomodulação a laser não foi tão eficaz quanto a combinação de laser e Bio-Oss®, e que este último pode ser utilizado na regeneração tecidual guiada no tratamento de defeitos ósseos para obter melhores resultados.

Embora tenham sido demonstrados efeitos positivos dos substitutos ósseos associados a Terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) na proliferação de células ósseas (Pinheiro et al., 2012; Marques et al., 2014; Rosa et al., 2014; Fernandes et al., 2017), e na reparação óssea propriamente dita Rasouli et al. (2014), mais estudos são necessários sobre o processo de reparação óssea em animais para determinar a segurança e a eficácia da aplicação clínica em humanos. Neste contexto, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do Bio-Oss® e da Terapia com laser 660 nm, em 45 J/cm², no processo de reparação óssea por meio das análises histomorfométrica e imunohistoquímica em ratos.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Buscou-se avaliar o reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com matriz óssea mineralizada de osso bovino e laser de baixa intensidade em aplicação única por meio das análises histomorfométrica e imunohistoquímica em ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA e foi aprovado pelo Comitê de Ética Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP (Anexo A). A descrição deste trabalho foi feita seguindo as diretrizes do *Animal research: Reporting in vivo experiments - ARRIVE* (Kilkenny et al., 2010).

3.1 Desenho do estudo

O cálculo amostral foi feito a partir de estudos anteriores onde pode-se obter a variabilidade dos dados ao redor de 0.5 mm^2 para a área de neoformação óssea. Assim, com a ajuda do programa Minitab (versão 17.1, 2013) e do programa estatístico *PIFACE Russ Lenth* (Softpedia, Bucharest, Romania) Russel V. Lenth (versão 1.76, 2011) foi realizado um estudo de poder de teste. Verificou-se que com $n = 6$ para cada subgrupo é possível detectar uma diferença média do efeito “Tratamento” igual a 0.8 mm^2 com poder de 80%.

Foram utilizados 72 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar), com 90 dias de idade, peso aproximado de 300g, fornecidas pelo Biotério Central da Unesp – Campus de Botucatu-SP. Os ratos foram alocados em gaiolas apropriadas e receberam dieta e água *ad libitum*. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (C, B, L, B+L) como apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 - Distribuição dos grupos e modalidades de tratamento dos defeitos ósseos

Grupo	Tratamento
Grupo Controle (C)	Defeito ósseo + Coágulo sanguíneo
Grupo Bio-Oss® (B)	Defeito ósseo + matriz óssea mineralizada de osso bovino
Grupo irradiado com Terapia com Laser de baixa potência (L)	Defeito ósseo + LLLT
Grupo Bio-Oss® associado à Terapia com Laser de baixa potência (B+L)	Defeito ósseo + matriz óssea mineralizada de osso bovino + LLLT

Fonte: Elaborado pelo autor.

Cada grupo foi subdividido de acordo com os períodos de observação de 07 (Sella et al., 2015), 30 e 60 dias (Rasouli et al., 2014), com 6 ratos em cada subgrupo com base no cálculo amostral. Esses períodos foram escolhidos tendo em vista a ação da LLLT na fase inicial de reparação tecidual e com a intenção de elucidar o processo de osteogênese a curto e médio prazo, e de remodelação a longo prazo.

3.2 Procedimento cirúrgico

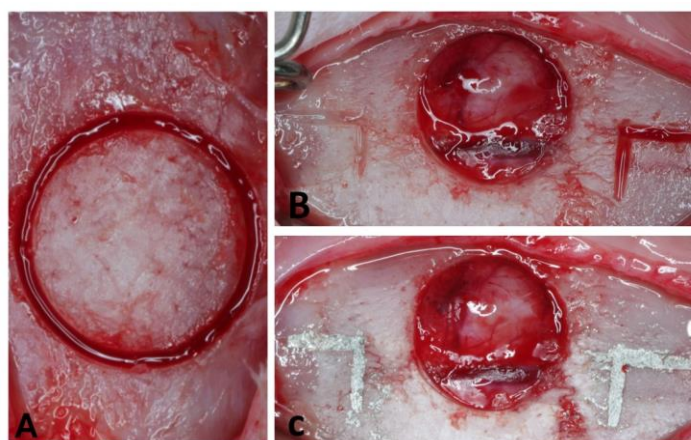
Para a realização das cirurgias e eutanásia, os animais foram anestesiados com uma solução de 13 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Anasedan – Ceva Brasil), substância com propriedades sedativas e analgésicas, além de relaxante muscular e 33 mg/Kg de ketamina base (Dopalen – Ceva Brasil), anestésico geral, via intramuscular.

Após anestesia, foi realizada a tricotomia da região superior da cabeça e assepsia com clorexidina. Em seguida, uma incisão longitudinal na pele, com cerca de 1 cm foi feita ao longo da sutura sagital, expondo a calvária. O periósteo também foi incisado. Os tecidos moles foram afastados com o auxílio de afastadores de tamanho adequado à região de trabalho.

Em cada animal foi realizado um único defeito ósseo de tamanho crítico com 5 mm de diâmetro, com 19,62 mm² de área (Calixto et al., 2011; Nagata et al., 2013), utilizando-se um motor elétrico que permite velocidade controlada em 800 RPM e uma broca trefina sob constante irrigação com soro fisiológico estéril (Figura 1a). Durante o procedimento cirúrgico houve cuidado para se evitar danos à dura-máter ou ao seio sagital superior. Em seguida, utilizando-se ponta de ultrassom em forma de lâmina (W1-0-CVDentus) em um aparelho piezocirúrgico (DentSurg CVDentus Sao José, SP, Brasil) sob irrigação constante foi confeccionada uma marcação em formato de “L” a 2 mm da borda do defeito no local correspondente ao seu maior diâmetro (Figura 1b), a marcação então foi preenchida com amálgama (Figura 1c) (Messora et al., 2008). Após essa etapa, o biomaterial e a terapia com laser de baixa intensidade foram colocados e realizados de acordo com o quadro 1 descrito anteriormente. O tecido subcutâneo e a pele foram suturados com fio de seda 4,0 e foi

administrada uma medicação analgésica (Dipirona Sódica Monohidratada - 150 mg/Kg, via subcutânea, a cada 08 horas por 48 horas). O dia da cirurgia foi definido como dia zero.

Figura 1 – Representação do procedimento cirúrgico



Legenda: A) marcação do defeito de tamanho crítico; B) marcação em formato de “L” correspondente ao maior diâmetro do defeito; C) marca em “L” preenchida com amálgama.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.1 Modalidades de tratamento

No grupo C, os animais não foram submetidos a nenhuma modalidade de tratamento, ficando no interior do defeito cirúrgico apenas o coágulo sanguíneo, servindo como grupo controle (Figura 2C).

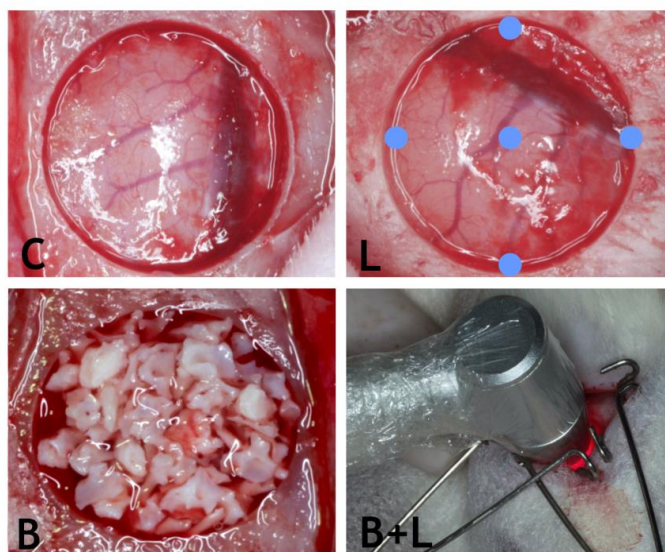
O Bio-Oss® (Geistlich Biomaterials GmbH) é um substituto ósseo xenógeno, que se caracteriza por ser uma matriz óssea mineral porosa de osso bovino cortical ou esponjoso, granulação utilizada neste estudo: 0,25-1,0 μm de

diâmetro – 0,5 g (Stavropoulos et al., 2003; Iezzi et al., 2008). O material foi utilizado de forma que ocupou todo o defeito ósseo realizado na cirurgia (Figura 2B).

Para a Terapia com Laser de baixa intensidade de laser de arsenieto de gálio e alumínio (GaAlAs, Laser DUO, MMOptics Ltda., São Carlos – SP, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm, 30 mW, área de 0,04 cm². A LLLT foi aplicada em 5 pontos de modo que toda a ferida cirúrgica recebeu o tratamento uniformemente. Foram distribuídos 4 pontos de aplicação ao longo das bordas da ferida cirúrgica em sentido horário de 3, 6, 9 e 12 horas, respectivamente. E um ponto de aplicação localizado na região central da ferida cirúrgica (Figura 2L, 2B+L). A irradiação foi liberada por 12 segundos por ponto (tempo total de exposição de 1 minuto), com uma densidade total de energia de 45 J/cm². A irradiação com laser aconteceu durante o procedimento cirúrgico em uma única aplicação diretamente no defeito ósseo criado cirurgicamente.

Em 07, 30 e 60 dias, os animais de cada grupo foram eutanasiados pela aplicação de anestesia geral em dose triplicada, após os testes de sensibilidade os animais foram decapitados em guilhotina. Em seguida a calvária foi removida para análise.

Figura 2 – Representação das modalidades de tratamento



Legenda: B= Grupo Bio-Oss[®], C= Grupo Controle, L= Grupo irradiado com Terapia com Laser de baixa intensidade (LLLTT), B+L= Grupo Bio-Oss[®] associado à Terapia com Laser de baixa intensidade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Processamento histológico

Para as análises histológica e histomorfométrica, a área operada foi fixada em formol a 10% por um período máximo de 48 horas. Cada espécime foi catalogado. Em seguida teve início o processo de descalcificação em ácido fórmico (Merck KGaA, em Darmstadt, Alemanha) na concentração de 20% (Rasouli et al., 2014), durante sete dias. Após a descalcificação os espécimes foram embebidos em parafina.

Os cortes foram realizados no sentido transversal das peças assim que foi observado o aparecimento de amálgama, sinalizando a região de maior diâmetro

do defeito. Os cortes continham espessura de 5 μm e foram realizados de forma semi seriado, intercalados pelos cortes de 4 μm que seriam encaminhados para o processamento imunohistoquímico.

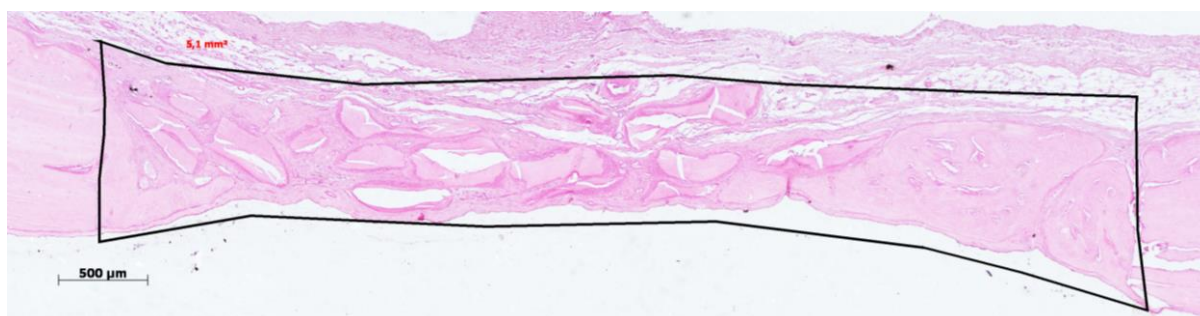
No total, foram realizados cortes com 5 μm de espessura para confecção de 10 lâminas, cada uma contendo pelo menos três cortes seriados, em seguida esses cortes foram corados por hematoxilina-eosina e examinados em microscopia de luz (Messora et al., 2008; Nunes et al., 2019). Para análise histomorfométrica apenas três das dez lâminas de cada espécime foram selecionadas, e de cada uma dessas três lâminas o melhor corte era escolhido para a análise, totalizando três imagens panorâmicas para análise de cada animal. A captura de imagens dos cortes foi a partir de um microscópio de luz Axiophot 2 (Carl Zeiss Oberköchen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss Oberköchen, Alemanha) que as transmite para o programa computacional AxioVision Release 4.7.2. Um único examinador fez a captura das imagens que receberam códigos e posteriormente foram analisadas por um outro examinador, permitindo o cegamento dos dados.

3.3.1 Histomorfometria

A análise histomorfométrica foi realizada por um único examinador devidamente calibrado. Seis cortes foram selecionados e nesses cortes uma medida foi tirada, após 24h as medidas eram novamente tomadas, essas medidas foram submetidas ao teste de correlação de Pearson por um segundo pesquisador e o examinador foi considerado calibrado até que o mesmo atingisse pelo menos $\rho=0,9$ de concordância entre os exames, neste caso o examinador atingiu $\rho=0,98$

de correlação entre as medidas. A análise foi realizada em aumento de X5. As medidas histomorfométricas foram realizadas a partir de foto micrografias montadas em forma de uma fotografia panorâmica onde era possível visualizar o defeito em toda a sua extensão. A análise histomorfométrica foi feita com utilização do programa computacional AxioVision Release 4.7.2. O critério a seguir foi utilizado para padronizar a análise das imagens digitais (Messora et al., 2008): área total (em mm^2) correspondente à área total do defeito cirúrgico original, determinada pela identificação das superfícies externa e interna do osso original da calvaria e das bordas direita e esquerda do o defeito cirúrgico e, em seguida, conectando-os com linhas desenhadas de acordo com suas respectivas curvaturas (Figura 3).

Figura 3 – Delimitação da área total do defeito cirúrgico para posterior análise histomorfométrica do osso neoformado e fechamento do defeito



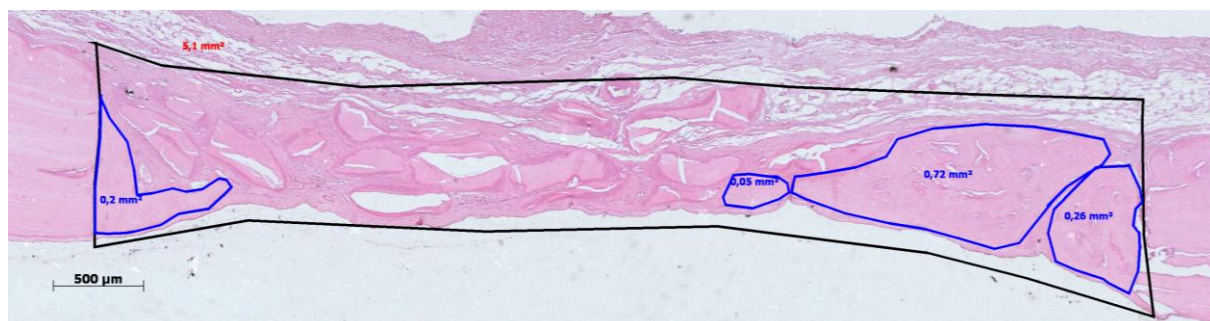
Fonte: Elaborado pelo autor.

O osso imaturo recém-formado foi identificado pela borda do defeito adjacente ao osso lamelar original. A área óssea recém-formada (em mm^2) foi delineada dentro da área total do defeito. A área total foi considerada 100% da

área a ser analisada. As áreas de neoformação óssea dentro dos defeitos foram calculadas como uma porcentagem da área do defeito. O osso imaturo recém-formado foi identificado pelo crescimento ósseo no defeito adjacente ao osso lamelar original. As imagens possuíam códigos que não permitiam a identificação do grupo experimental ao qual pertenciam, possibilitando uma análise cega dos dados. Foram feitas as seguintes medidas:

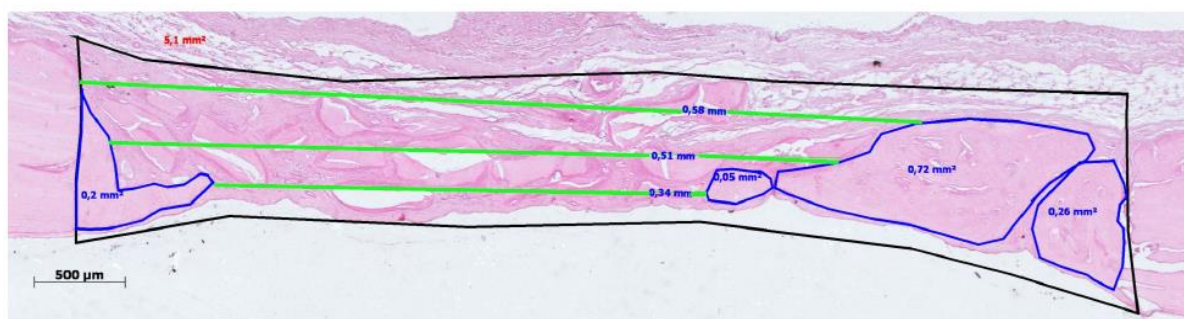
- Área total (AT): área total do defeito cirúrgico (mm^2) (Figura 3).
- Área de neoformação total (AN): proporção da área de neoformação óssea dentro dos limites determinados entre as bordas do defeito em % (Figura 4).
- Área de neoformação de osso lamelar (ANL): proporção de neoformação óssea lamelar em % próxima as bordas do defeito no lado direito e esquerdo (Figura 4).
- Área de neoformação óssea intramembranosa (ANI): proporção de neoformação óssea intramembranosa em % na região central do defeito, separado do osso formado nas bordas (Figura 4).
- Distância central entre as bordas de osso neoformado (MC): medida linear em mm da distância remanescente entre as bordas de osso neoformado (Figura 5).
- Distâncias entre as corticais formadas no osso neoformado: medida linear em mm da distância remanescente entre as corticais já formadas do osso neoformado nas bordas, na região superior (MCS) e inferior (MCI) (Figura 5).

Figura 4 – Delimitação da área de neoformação óssea localizada dentro do defeito cirúrgico como análise histomorfométrica



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5 – Delimitação das distâncias remanescentes entre as bordas de osso neoformado dentro do defeito cirúrgico



Fonte: Elaborado pelo autor

3.3.2 Reações de imunohistoquímica

Para preparação da análise imunohistoquímica, foram confeccionados no total 12 lâminas com cortes semi seriados com 4 μ m de espessura e estendidos em lâminas previamente tratadas pelo 3-aminopropiltrietoxisilano (Sigma Chemical CO. St. Louis, USA).

As amostras receberam processamento imunohistoquímico seguindo o protocolo descrito: Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100° - 100° - 100° - 90° - 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato, pH 6,0 (EP-12- 20557 Easy Path), em câmara pressurizada (Decloakingchamber®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) com dois ciclos de temperatura, a 93°C, por 4 minutos e 70°C, por 25 segundos.

No final de cada etapa da reação imunohistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em PBS-triton 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente.

As lâminas contendo amostras de cada grupo foram divididas em quatro lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: *anti-RANKL* - (1:100, Goat anti-RANKL, SC-7628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), *anti-OPG* (1:200, Goat anti-OPG, SC-8468, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), *anti-TRAP* (1:100, Goat anti-TRAP, SC-30833, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA).

Os anticorpos primários foram colocados em solução diluente do anticorpo (Spring ADS-125) e as lâminas foram colocadas em uma câmara

úmida durante 16–18 horas a 4°C de temperatura. Os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário histofine (Easy Link one EP-12-20501) por 30 minutos em temperatura ambiente.

Foi realizada a revelação utilizando-se como cromógeno o 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA) e a contracoloração com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

Um examinador treinado e cego aos tratamentos selecionou um corte histológico de cada um dos biomarcadores (RANKL, OPG e TRAP) de cada espécime para a análise da imunomarcação de reabsorção e neoformação óssea em um aumento de X40.

A área de análise foi delimitada da mesma forma que ocorreu no processo de histomorfometria, então, foi realizada uma análise semiquantitativa da imunomarcação localizada apenas no osso neoformado no interior do defeito. Nesta região, foram contadas as células/área (Buduneli et al., 2007; Brasilino et al., 2018) com marcação específica para cada anticorpo baseando-se na metodologia previamente descrita por Buduneli et al. (2007), no presente estudo os scores estabelecidos foram:

- 0 = sem marcação
- 1 = baixa marcação (<8 células imunorreativas)
- 2 = marcação moderada (9 a 14 células imunorreativas)
- 3 = marcação intensa (15 a 20 células imunorreativas)
- 4 = marcação muito intensa (≥ 20 células imunorreativas)

3.4 Análise estatística

Para análise dos dados obtidos durante a análise histomorfométrica foram obtidos 84 dados que foram submetidos à análise estatística por meio dos programas computacionais: MINITAB (Minitab, *version* 12.0, 1998) e GraphPAAd PRISM (versão 6, 2013).

A estatística descritiva consistiu no cálculo de médias e desvio padrão, enquanto a estatística inferencial consistiu no teste de análise de variância (ANOVA) dois fatores (Tempo e Tratamento), efeito fixo. O estudo do efeito interação foi conduzido por meio do gráfico de médias. O poder do estudo foi de 80%, e o nível de significância escolhido foi o valor convencional de 5%.

Já para a análise dos resultados da imunohistoquímica foi feita uma análise semiquantitativa em forma de *scores*, onde os resultados foram dispostos em gráficos com porcentagem para visualização da distribuição e proporção da imunomarcção presente nos espécimes analisados.

4 RESULTADO

Durante a realização das cirurgias 04 espécimes foram à óbito, sendo 02 espécimes do grupo B de 07 dias, e 02 do Grupo B+L de 07 dias, a causa das perdas foi dada como indeterminada, os ratos vieram a óbito antes do efeito anestésico passar.

Os demais animais utilizados para a pesquisa permaneceram em bom estado de saúde durante todo o período de experimento, ao final, foram analisados os dados obtidos de 68 espécimes.

4.1 Análise histológica descritiva

Em 07 dias, foi possível visualizar o defeito em toda sua extensão sem neoformação óssea com as bordas do osso nativo com nitidez em todos os espécimes (Figuras 6, 7, 8 e 10), porém, em poucos espécimes dos grupos L e B+L foi possível observar pequenas ilhas de matriz osteóide próximas às bordas do defeito (Figuras 9 e 11), nos grupos C e L a região do interior do defeito se mostrou ocupado por coágulo (Figuras 6 e 8).

Aos 30 dias após a cirurgia foi possível observar a presença de neoformação óssea em todos os espécimes, e no geral de forma concentrada nas regiões perto das bordas do defeito cirúrgico (Figuras 12, 13, 15 e 17). Em alguns espécimes do B-30 dias é possível visualizar novo osso formado entre os espaços das partículas remanescentes de biomaterial (Figura 14), nos grupos L e B+L é possível observar novo osso formado de forma desorganizada ao lado e

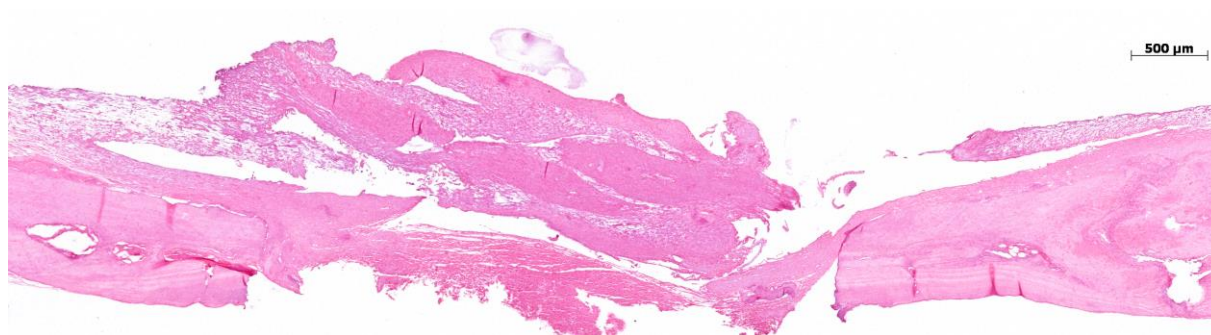
acima da borda do defeito cirúrgico, com vasos sanguíneos (Figuras 16 e 18).

Em 60 dias, a maioria dos espécimes apresentou neoformação óssea. No grupo C os espécimes apresentaram novo osso formado de forma concentrada nas bordas do defeito (Figura 19), enquanto que em muitos espécimes dos grupos L, B e B+L foi possível notar uma faixa estreita de osso neoformado ao longo de quase toda a extensão do defeito cirúrgico, entretanto mais fina do que o osso original da calvária (Figuras 20, 21 e 22).

Também foi possível observar em todos os grupos e períodos experimentais, tecido conjuntivo denso e infiltrado inflamatório que se estendia por todo o defeito cirúrgico.

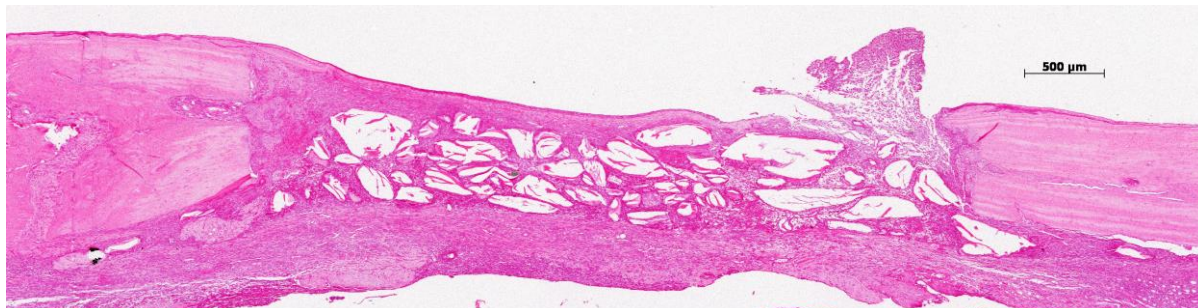
Nos espécimes do Grupo B e do Grupo B+L, foi possível notar a presença de espaços que seriam ocupados pelo biomaterial e/ou por partículas residuais do biomaterial em 07, 30 e 60 dias (Figuras 7, 9, 13, 14, 17, 18, 20 e 22).

Figura 6 – Espécime do grupo C - 07 dias; fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico



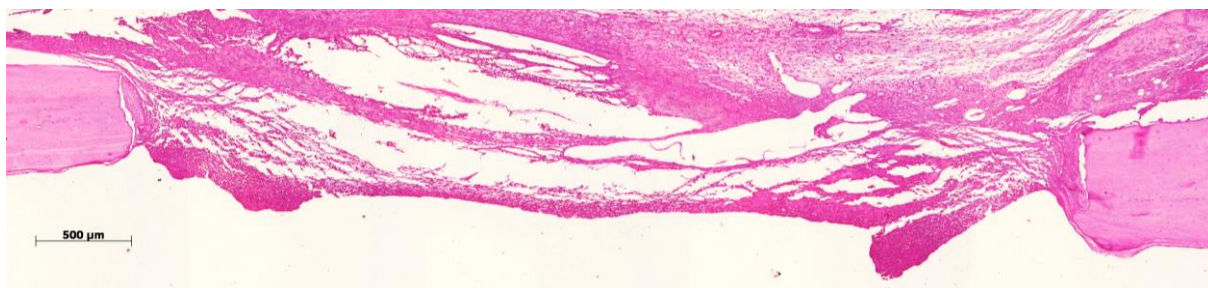
Legenda: Coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 - Espécime do grupo B - 07 dias; fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico



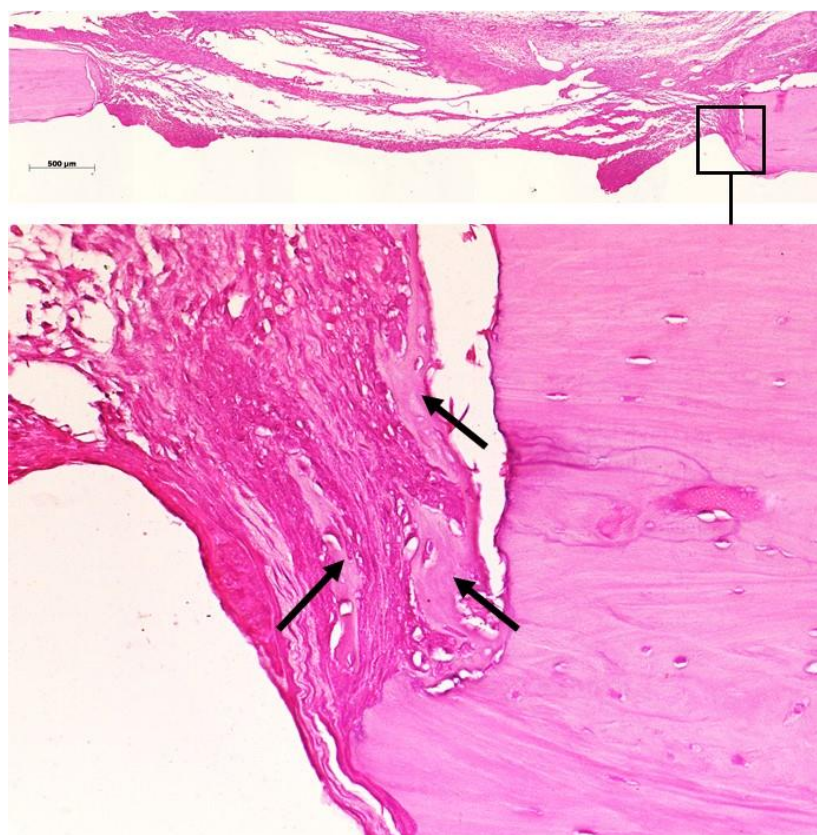
Legenda: coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 - Espécime do grupo L - 07 dias; fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico



Legenda: coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5.
Fonte: Elaborado pelo autor.

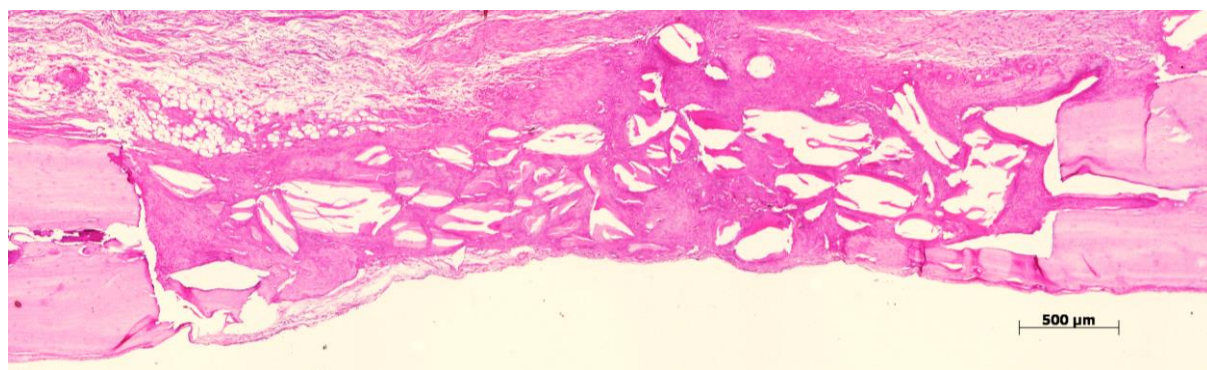
Figura 9 – Espécime do Grupo L – 07 dias



Legenda: fotomicrografia da matriz osteóide (seta preta) observada próximo às bordas (coloração hematoxilina e eosina, aumento original X10).

Fonte: Elaborado pelo autor.

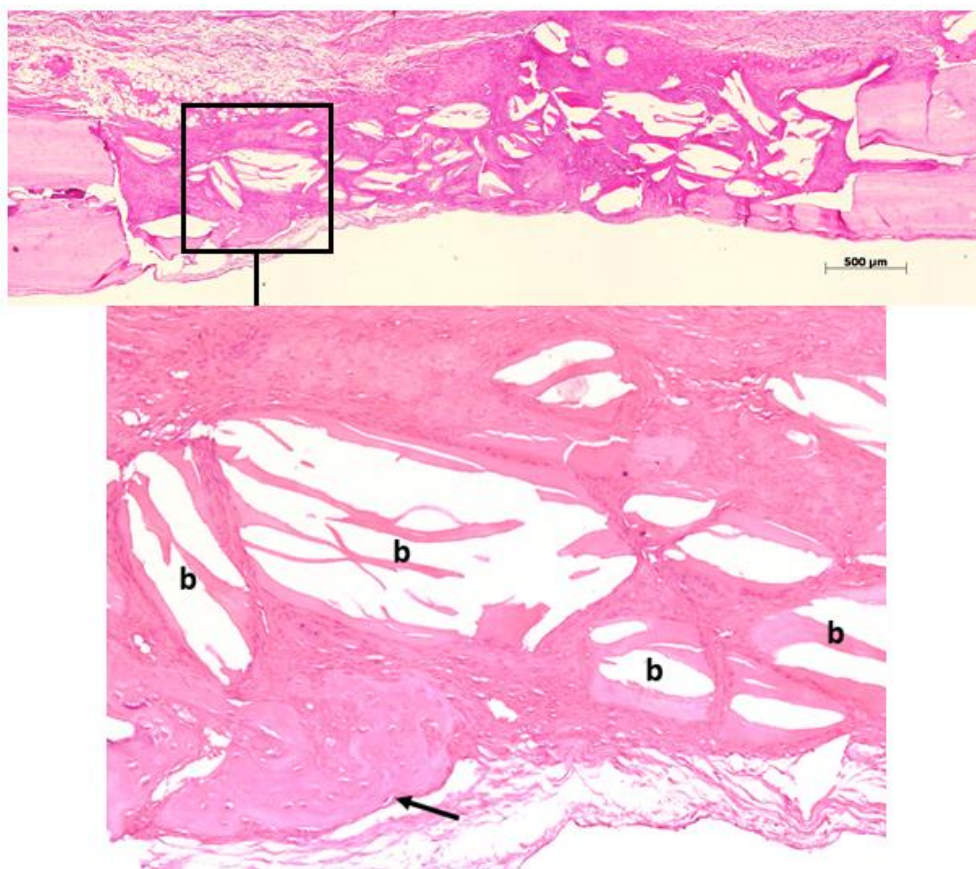
Figura 10 - Espécime do grupo B+L - 07 dias; fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico



Legenda: coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5.

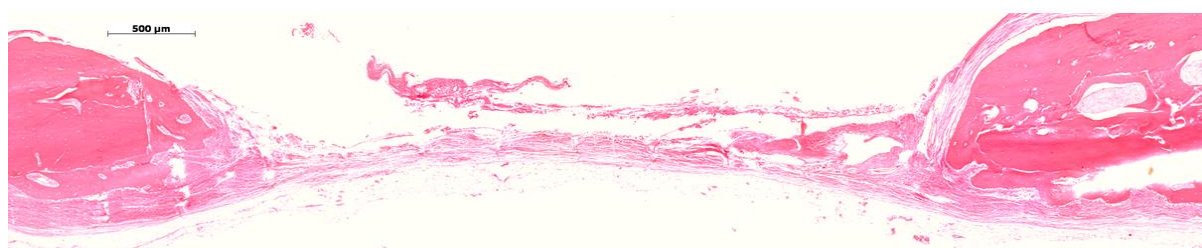
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 – Espécime do Grupo B+L – 07 dias



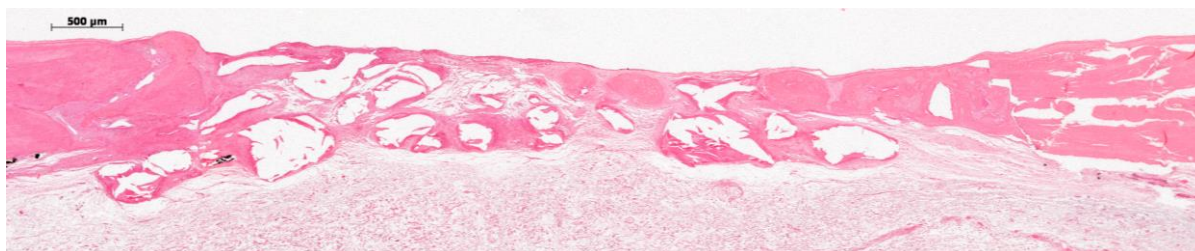
Legenda: fotomicrografia da matriz osteóide (seta preta) observada próximo às bordas e entre o espaço ocupado pelas partículas de biomaterial (b) (coloração hematoxilina e eosina, aumento original X10).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 - Espécime do grupo C - 30 dias; fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico



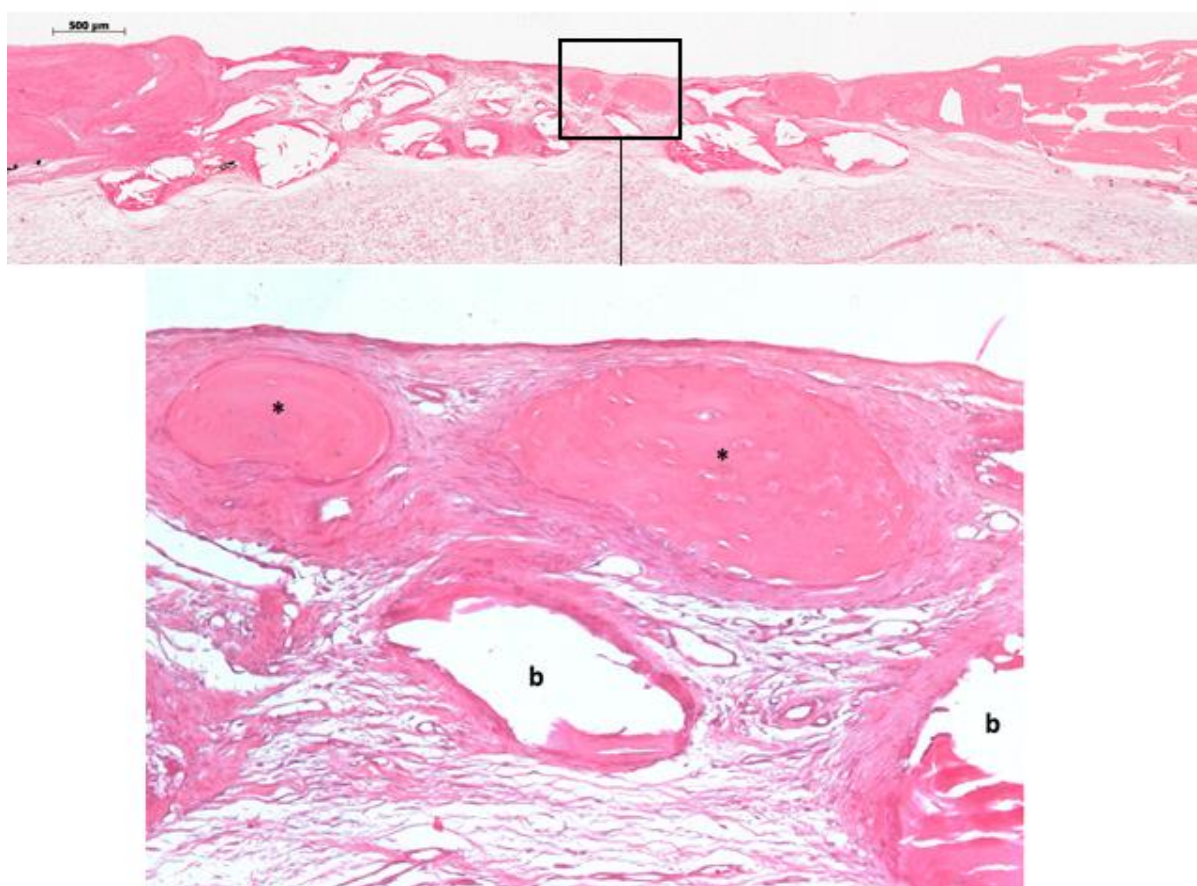
Legenda: coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 - Espécime do grupo B - 30 dias; fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico



Legenda: coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5.
Fonte: Elaborado pelo autor.

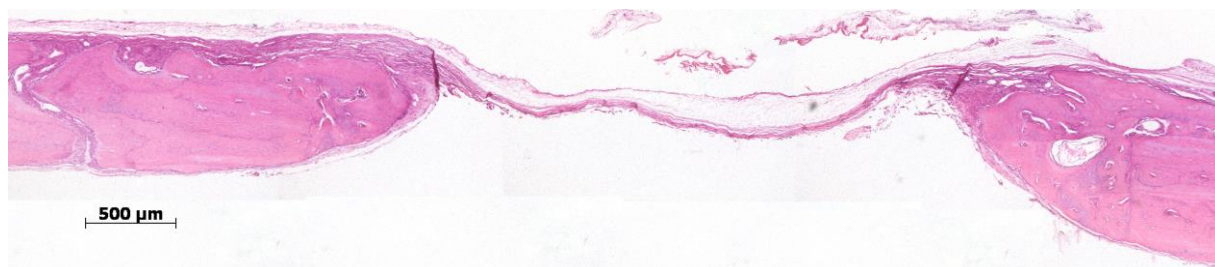
Figura 14 – Espécime do Grupo B – 30 dias



Legenda: fotomicrografia do novo osso formado (*) no interior do defeito cirúrgico e espaços que seriam ocupados por partículas do biomaterial (b) (coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X 10).

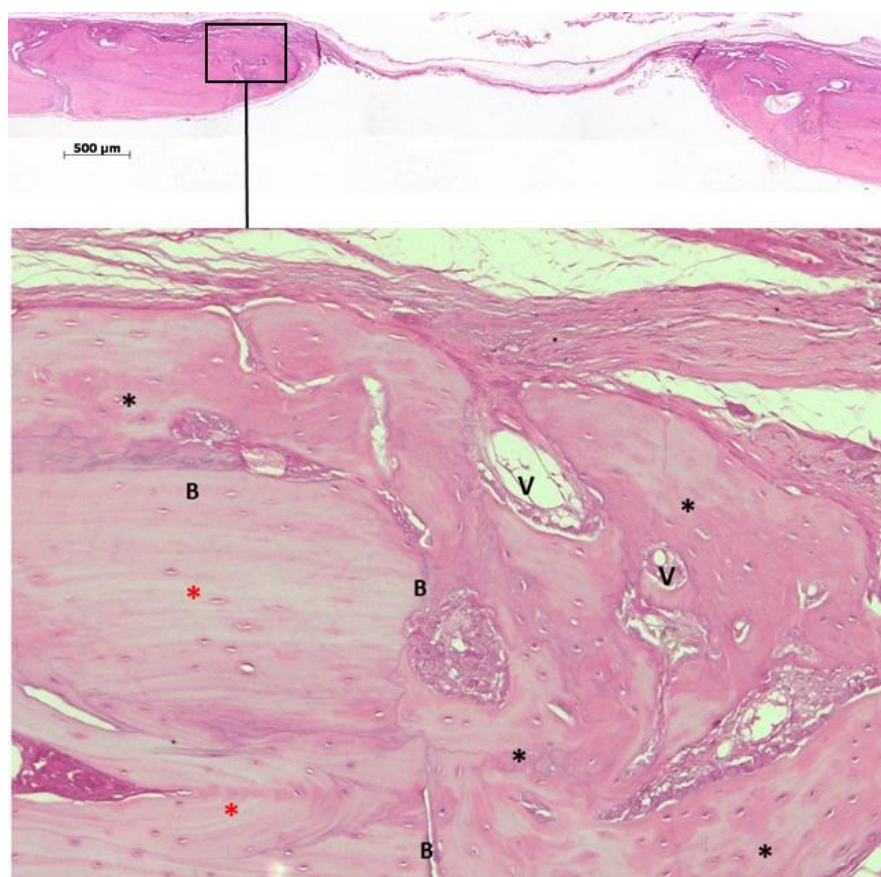
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Espécime do grupo L – 30 dias; fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico



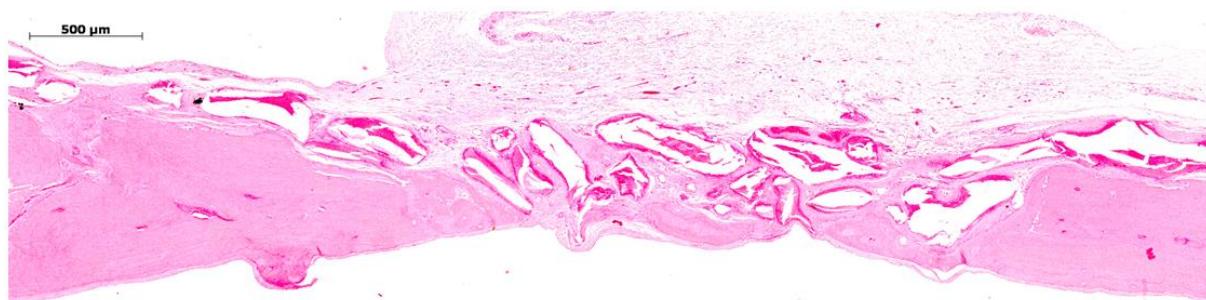
Legenda: coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 – Espécime do Grupo L – 30 dias



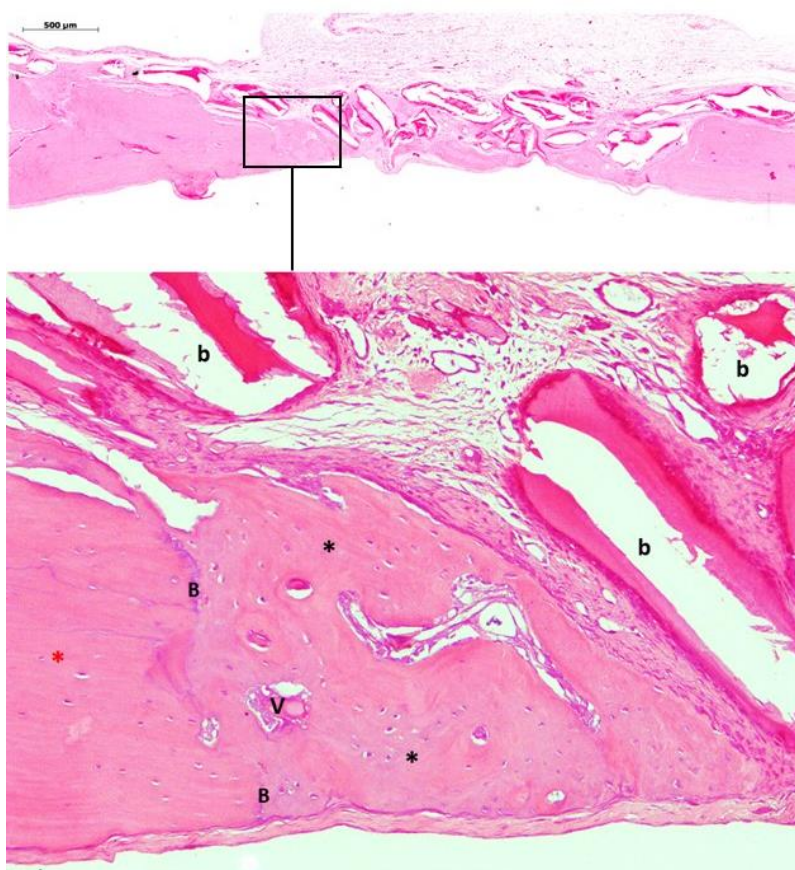
Legenda: fotomicrografia do osso neoformado (*) ao lado e acima da borda do defeito (B), é possível visualizar a desorganização do osso novo em comparação ao osso original (*) e presença de vasos sanguíneos (v) (coloração hematoxilina e eosina, aumento original X10).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 - Espécime do grupo B+L - 30 dias; fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico



Legenda: Coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5.
Fonte: Elaborado pelo autor.

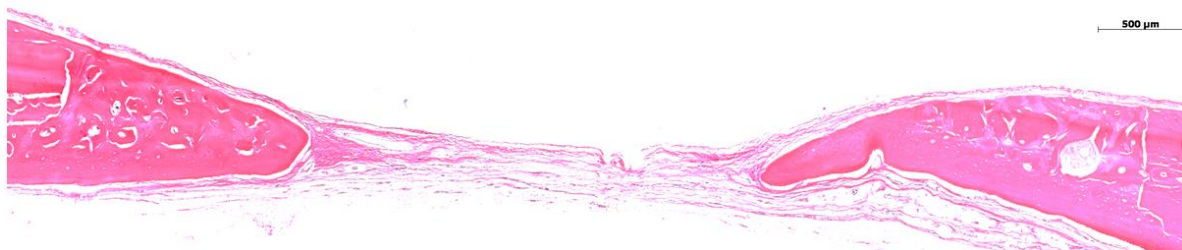
Figura 18 – Espécime do Grupo B+L – 30 dias



Legenda: fotomicrografia mostrando novo osso formado (*) ao lado da borda do defeito (B), é possível visualizar a desorganização do osso novo em comparação ao osso original (*) e presença de vasos sanguíneos (v) (coloração hematoxilina e eosina, aumento original X10).

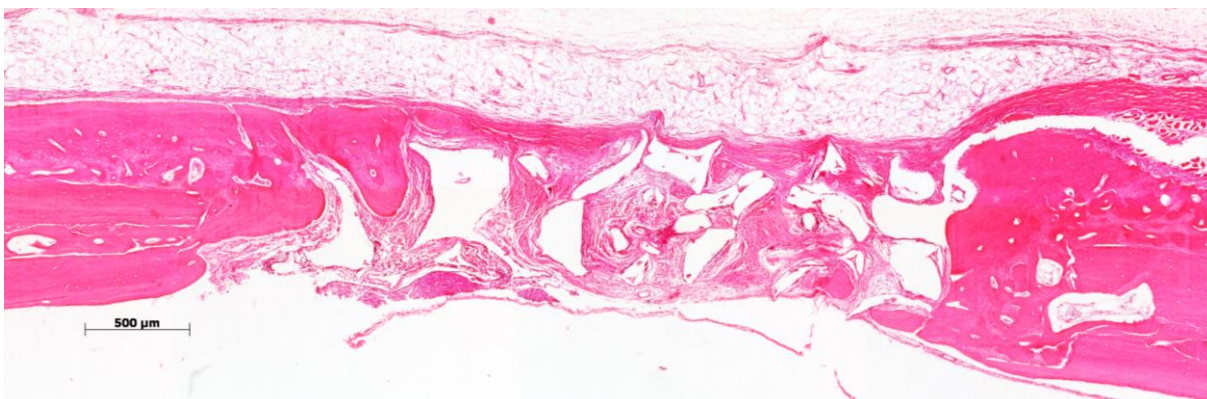
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 - Espécime do grupo C - 60 dias; fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico



Legenda: Legenda: Coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 - Espécime do grupo B - 60 dias; fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico



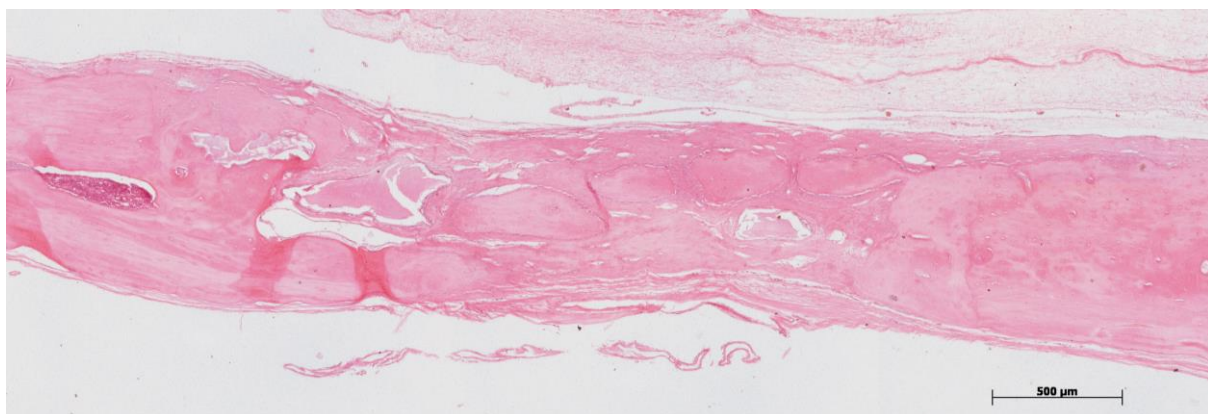
Legenda: Coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 - Espécime do grupo L - 60 dias; fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico



Legenda: Coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 - Espécime do grupo B+L - 60 dias; fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico



Legenda: Coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.1 Análise histomorfométrica

Aos 7 dias os espécimes dos quatro grupos (C, B, L e B+L) apresentaram resultados semelhantes em todas as medidas feitas (Tabela 1).

Em 30 dias, no parâmetro da Área Total do Defeito (AT) o grupo C demonstrou diferença estática significativa relativa aos grupos B (Cvs.B, $p=0,0001$) e B+L (Cvs.B+L, $p=0,0046$), o grupo L demonstrou ser estatisticamente semelhante ao grupo C, porém estatisticamente diferente e inferior apenas ao grupo B (Lvs.B, $p=0,0399$), enquanto que B+L e B resultaram como semelhantes estatisticamente. Os parâmetros da Área de Neoformação (AN) e Área de Neoformação Lamelar (ANL) apresentaram resultados estatísticos semelhantes, em ambos os parâmetros os grupos C e L apresentaram-se semelhantes estatisticamente, sendo os valores superiores ao do grupo B e semelhantes ao do grupo B+L, que por sua vez resultou em semelhança estatística com o grupo B (Tabela 1). Na medida da proporção da Área de Neoformação Intramembranosa (ANI) não houve diferença estatística significativa entre as modalidades de tratamento.

Com relação aos parâmetros lineares aos 30 dias, na Medida Linear Central (MC), os grupos C e L apresentaram os menores valores, esses valores se demonstraram ser estatisticamente diferentes ao apresentado pelo grupo B; que por sua vez se apresentou como semelhante de B+L, sendo este último também semelhante aos valores apresentados pelos grupos C e L. Na Medida linear entre Cortical Superior (MCS) o grupo C demonstrou resultados estatisticamente superiores e significativos em comparação aos grupos B, L e B+L. Na Medida linear entre Cortical Inferior (MCI) não houve diferenças

estatísticas significativas entre os valores apresentados pelos grupos de tratamento.

Em 60 dias, no parâmetro Área total do defeito (AT) os grupos B e B+L demonstraram diferenças estatisticamente significativas e superiores ao grupo C (Cvs.B, $p=0,0246$, Cvs.B+L, $p=0,0062$), o grupo L demonstrou resultado estatístico semelhante a todos os outros grupos (Figura 22). Com relação à proporção de Neoformação óssea (AN) os grupos C e L apresentaram resultados semelhantes, e superiores e estatisticamente significativos aos grupos B e B+L (Tabela 1, e Figura 23). Na Área de neoformação óssea lamelar (ANL) o grupo C apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo B e B+L, e semelhante ao grupo L, este último não apresentou diferença estatística com os grupos B e B+L.

Com relação às três medidas lineares, aos 60 dias os grupos apresentaram fechamento da ferida cirúrgica de forma semelhante e no geral superiores aos períodos de observação de 07 e 30 dias, mesmo sem diferenças estatísticas significantes (Figura 24).

Tabela 1 - Resultados das análises histomorfométricas dos espécimes após 07, 30 e 60 dias dos tratamentos realizados

	Tempo	C	B	L	B+L
AT (mm²)	07 dias	2,19±0,84 Aa	1,60±0,44 Aa	1,66±0,69 Aa	1,61±0,40 Aa
	30 dias	1,07±0,29 Ba	3,05±1,4 Bb	1,88±0,50 Aac	2,58±0,75 ABbc
	60 dias	1,76±0,40 Aa	3,02±0,63 Bb	2,45±0,53 Aab	3,23±1,01 Bb
AN (%)	07 dias	0,03±0,07 Aa	0±0 Aa	0±0 Aa	0±0 Aa
	30 dias	0,25±0,11 Ba	0,06±0,04 ABb	0,28±0,22 Ba	0,14±0,09 ABab
	60 dias	0,37±0,97 Ba	0,19±0,07 Bb	0,39±0,13 Ba	0,22±0,06 Bb
ANL (%)	07 dias	0,01±0,02 Aa	0±0 Aa	0±0 Aa	0±0 Aa
	30 dias	0,2±0,07 Ba	0,05±0,04 ABb	0,21±0,13 Ba	0,1±0,05 ABab
	60 dias	0,3±0,11 Ca	0,16±0,05 Bb	0,26±0,13 Bab	0,2±0,05 Bab
ANI (%)	07 dias	0,02±0,05 Aa	0±0 Aa	0±0 Aa	0±0 Aa
	30 dias	0,04±0,04 Aa	0,01±0,01 Aa	0,07±0,13 Aa	0,04±0,04 Ba
	60 dias	0,07±0,09 Aa	0,03±0,03 Aa	0,13±0,11 Aa	0,01±0,01 Ba
MC (mm)	07 dias	3,23±0,73 Aa	2,89±0,80 ABa	2,29±0,40 Aa	2,90±0,57 Aa
	30 dias	2,28±0,76 ABa	3,74±0,57 Ab	2,25±1,27 Aa	3,02±1,04 Aab
	60 dias	1,58±0,27 Ba	1,92±0,58 ABa	0,96±0,86 Ba	1,96±0,70 Aa
MCS (mm)	07 dias	3,39±0,92 Aa	2,90±0,65 ABa	2,45±0,56 Aa	3,42±1,07 Aa
	30 dias	2,51±0,79 Aa	4,00±0,82 Ab	2,67±1,27 Ab	3,08±0,99 Ab
	60 dias	2,23±0,64 Aa	2,24±0,71 ABa	1,52±1,05 Aa	2,19±0,92 Aa
MCI (mm)	07 dias	3,03±0,60 Aa	2,83±0,91 ABa	2,28±0,40 Aa	2,69±0,83 Aa
	30 dias	2,51±0,75 Aa	3,43±0,47 Aa	2,58±1,18 Aa	2,43±1,33 Aa
	60 dias	2,10±0,22 Aa	1,77±0,84 ABa	1,44±1,02 Aa	2,12±0,60 Aa

Legenda: Dados representados estão em média e desvio padrão.

AT: área total do defeito.

AN: proporção da área de neoformação óssea dentro do defeito.

ANL: proporção da área de neoformação óssea lamellar.

ANI: proporção área de neoformação óssea intramembranosa.

MC: distância central entre as bordas de osso neoformado.

MCS: distância entre as corticais superiores formadas no osso neoformado.

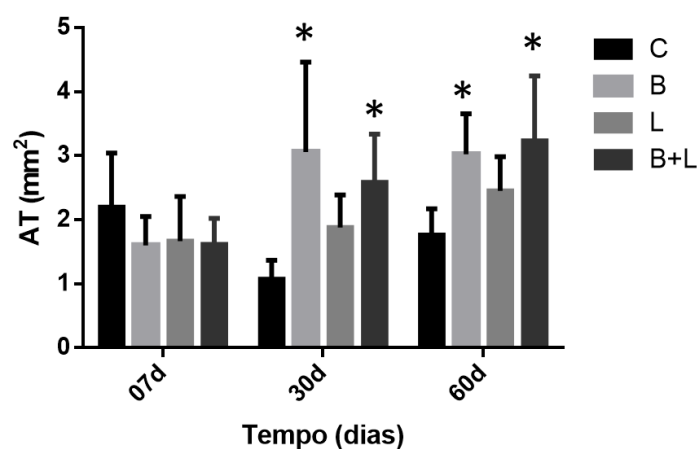
MCI: distância entre as corticais inferiores formadas no osso neoformado.

Letras maiúsculas diferentes - diferença significativa na análise intragrupo para cada parâmetro – $p < 0,05$ - *Two Way Analysis of Variance*.

Letras minúsculas diferentes - diferença significativa na análise intergrupo para cada parâmetro – $p < 0,05$ - *Two Way Analysis of Variance*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

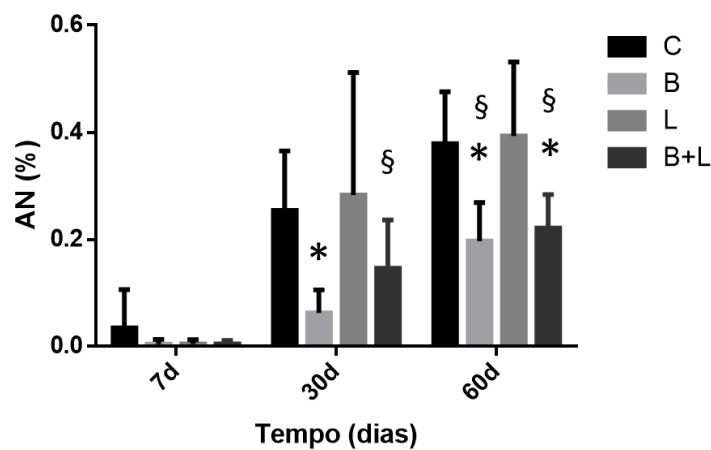
Figura 22 – Média e Desvio Padrão da Área total do defeito (AT) em mm²



Legenda: (*) representa diferença estatística significativa intergrupo do Grupo Controle (C).

Fonte: Elaborado pelo autor.

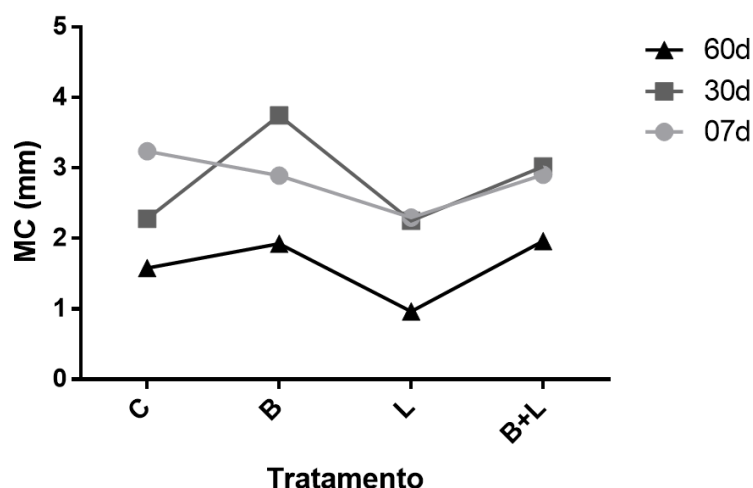
Figura 23 – Média e Desvio Padrão da Proporção de Área de Neoformação Óssea (AN) em porcentagem



Legenda: (*) diferenças estatísticas significativas intergrupo para o Grupo Controle (C) ($p < 0.05$), (§) diferenças estatísticas significativas intergrupo para o Grupo Laser (L) dentro do mesmo período ($p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24 – Médias das distâncias centrais entre as bordas do osso neoformado no interior do defeito (MC) em mm



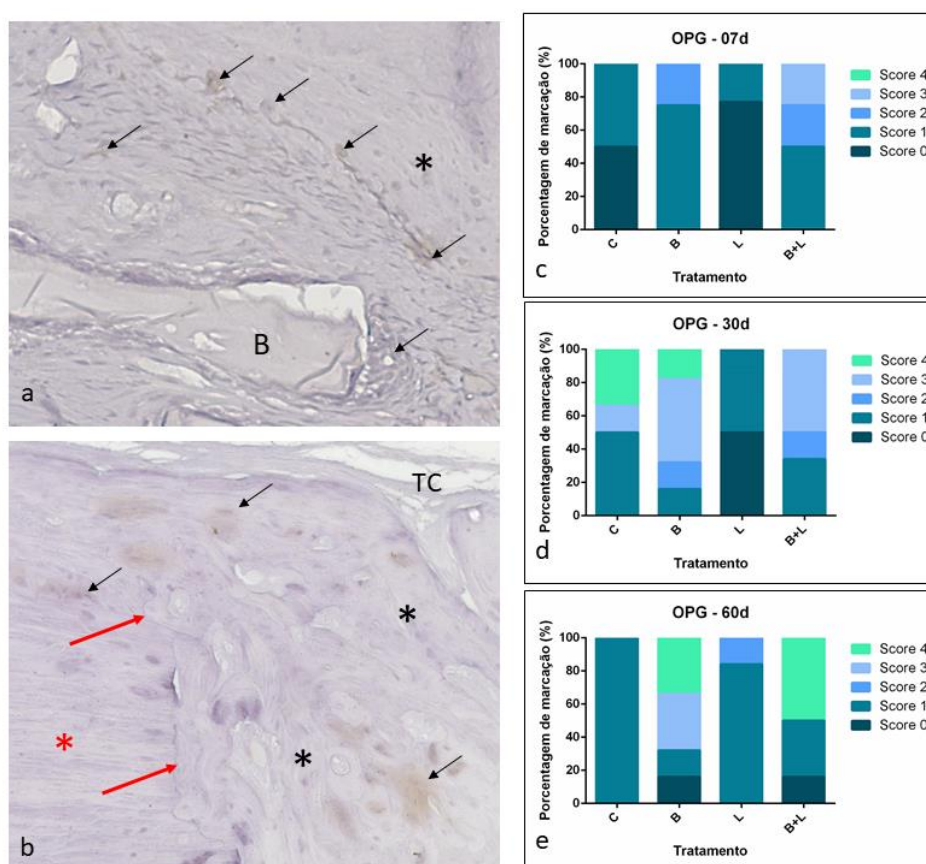
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Análise imunohistoquímica

Os espécimes apresentaram imunomarcção do biomarcador OPG intra e extracelular tanto em osteoblastos em processo de neoformação óssea, quanto em osteócitos aprisionados no interior do osso neoformado. Aos 07 dias, foi possível observar imunomarcção para OPG em osteócitos presentes em osso original próximos às bordas do defeito, essa marcação apresentou-se de forma moderada em alguns espécimes do grupo L e leve em alguns espécimes dos grupos B, B+L e C; e esse padrão continuou a ser observado nos períodos de 30 e 60 dias. Nos grupos B e B+L era comum encontrar matriz osteóide com imunomarcção próxima aos espaços remanescentes do biomaterial (Figura 24a), as imunomarcações para OPG encontravam-se em sua maioria em osso neoformado próximo às bordas dos defeitos cirúrgicos (Figura 24b).

Aos 7 dias, a imunomarcção do biomarcador OPG apresentou-se com *scores* com maior porcentagem de marcação nos grupos B (*score* 1- 75%; *score* 2 - 25%) e B+L (*score* 1 - 50%; *score* 2 - 25%; *score* 3 - 25%), enquanto nos grupos L e C os espécimes apresentaram *score* entre 0 e 2, sendo que no grupo L 77% dos espécimes apresentaram *score* 0, e no grupo C 50%. Aos 30 dias a porcentagem de *scores* elevados teve leve aumento nos grupos B (*score* 3 – 50%) e B+L (*score* 3 – 50%; *score* 4 – 18%), e grande aumento no grupo C (*score* 3 – 16%; *score* 4 – 34%), no grupo L os espécimes mantiveram-se no mesmo padrão de imunomarcção que aos 07 dias. Aos 60 dias a porcentagem da imunomarcção nos grupos B e B+L começou a diminuir com alguns espécimes apresentando *score* 0 (16%), porém em sua maioria mantiveram-se com *scores* elevados (B *score* 4- 34%, B+L *score* 4 – 50%); enquanto que o grupo L apresentou leve aumento tendo espécimes de *score* 1 (84%) e 2 (16%), a imunomarcção se manteve estável no grupo C ao apresentar *score* 1 (100%) (Figura 24 c, d e e).

Figura 24 – Fotomicrografias da imunomarcação para o biomarcador OPG na região de osso neoformado dentro do defeito e Gráficos da porcentagem da imunomarcação de OPG presente no osso neoformado dentro do defeito cirúrgico nos tempos de 07, 30 e 60 dias



Legenda: a) Grupo B 60 dias – marcação intracelular em osteoblastos em região de osso neoformado e da partícula de biomaterial próximo à borda direita do defeito cirúrgico (aumento original de X20). b) Grupo L 60 dias – marcação extracelular em região de osso neoformado próximo à borda esquerda do defeito cirúrgico (aumento original de X40). (→) marcação célula/área imunorreativa, (*) osso neoformado, (*) osso original, (→) borda do defeito cirúrgico, (B) biomaterial. c) Gráfico OPG-07d mostrando a distribuição dos Scores (em porcentagem) referente ao padrão de imunomarcação; d) Gráfico OPG-30d mostrando a distribuição dos Scores (em porcentagem) referente ao padrão de imunomarcação; e) Gráfico OPG-60d mostrando a distribuição dos Scores (em porcentagem) referente ao padrão de imunomarcação.

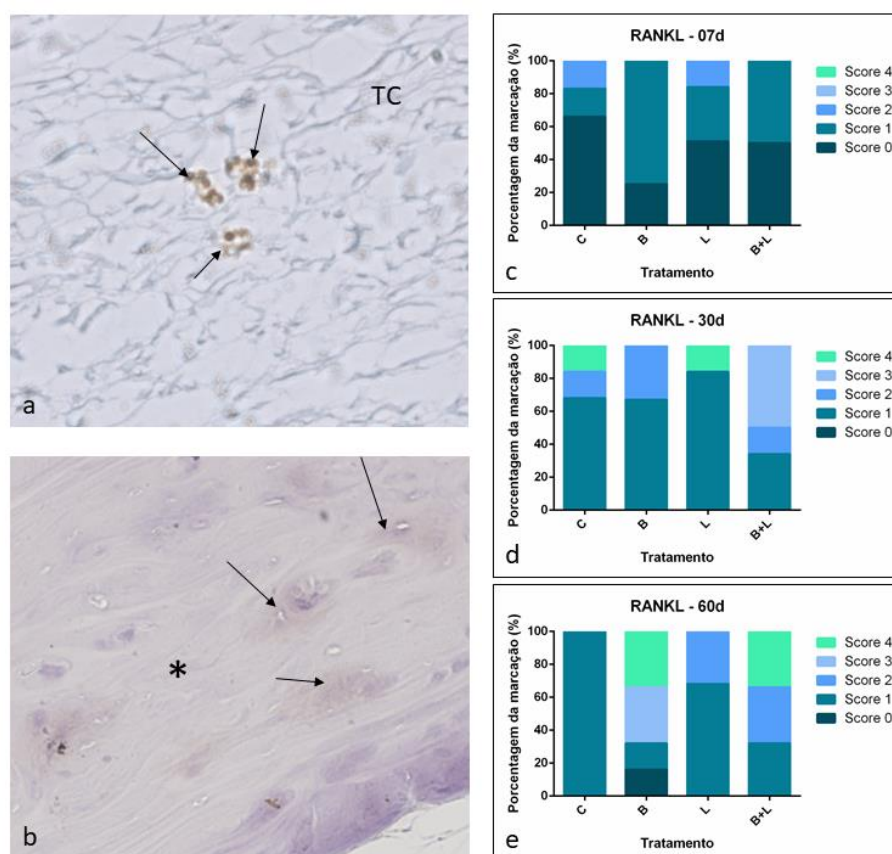
Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi observado imunomarcação intra e extra celular para o biomarcador RANKL, foi possível observar algumas células marcadas em tecido conjuntivo

próximo ao osso neoformado localizado dentro do perímetro delimitado do defeito (Figura 25a), porém as áreas com marcação extra celular estavam em sua maioria concentradas no osso neoformado próximo às bordas do defeito cirúrgico (Figura 25b). Em osso original, os espécimes aos 7 dias apresentavam baixa imunomarcação para RANKL.

Aos 7 dias, os espécimes apresentaram imunomarcação do biomarcador RANKL até *score* 2 nos grupos C (17%) e L (16%), e até *score* 1 nos grupos B (75%) e B+L (50%). Aos 30 dias a porcentagem de imunomarcação aumentou em todos os grupos, sendo mais considerável nos grupos L (*score* 1- 84%; *score* 4 – 16%) e C (*score* 1- 68%; *score* 2- 16%; *score* 4 – 16%), o *score* 3 foi o maior obtido no grupo B+L (50%). Aos 60 dias a porcentagem de imunomarcação do RANKL se apresenta de forma dividida no grupo B onde 16% dos espécimes apresentaram *score* 0 e outros 16% *score* 1, mas a maioria apresentou *score* 3 (34%) e 4 (34%), a porcentagem da imunomarcação no grupo B+L teve leve aumento, 34% dos espécimes apresentaram *score* 4, enquanto 34% apresentou *score* 2, e o restante 1. No grupo L, a porcentagem da imunomarcação caiu (*score* 1 – 68%, *score* 2 – 32%), no grupo C todos os espécimes obtiveram *score* 1 (Figura 25 c, d e e).

Figura 25 – Fotomicrografias da imunomarcação para o biomarcador RANKL na região de osso neoformado dentro do defeito e Gráficos da porcentagem de imunomarcação de RANKL presente no osso neoformado dentro do defeito cirúrgico nos tempos de 07, 30 e 60 dias



Legenda: a) Grupo L 60 dias – marcação intracelular em células do tecido conjuntivo na região central do defeito cirúrgico (aumento original de x40). b) Grupo L 60 dias – marcação extracelular ao redor de osteoblastos/osteócitos em osso neoformado próximo à borda direita do defeito cirúrgico (aumento original de x40). (→) marcação célula/área imunorreativa, (*) osso neoformado, (TC) tecido conjuntivo. c) Gráfico RANKL-07d mostrando a distribuição dos Scores (em porcentagem) referente ao padrão de imunomarcação; d) Gráfico RANKL-30d mostrando a distribuição dos Scores (em porcentagem) referente ao padrão de imunomarcação; e) Gráfico RANKL-60d mostrando a distribuição dos Scores (em porcentagem) referente ao padrão de imunomarcação.

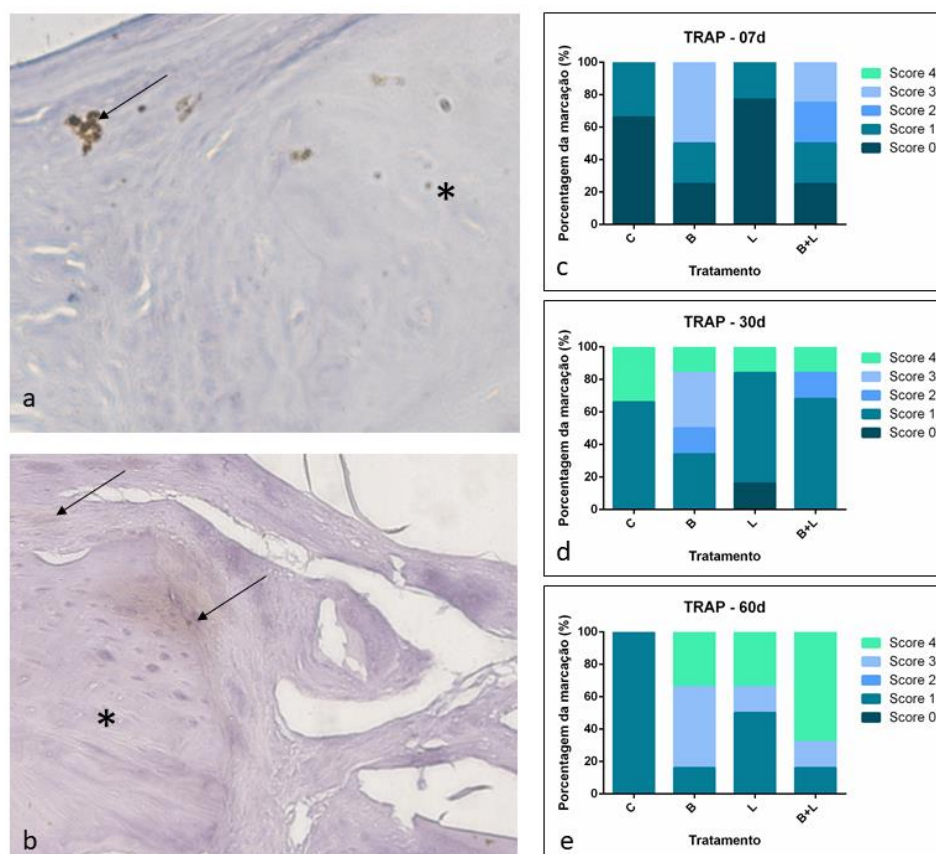
Fonte: Elaborado pelo autor.

Em alguns espécimes foi possível observar imunomarcação de células imunorreativas para TRAP em tecido conjuntivo próximo ao osso neoformado

(Figura 26a). De forma geral as imunomarcações ao biomarcador TRAP se apresentaram concentradas próximas ou nas bordas de osso neoformado (Figura 26b).

Aos 7 dias a porcentagem da imunomarcação do biomarcador TRAP se mostrou menor nos grupos L (*score* 0 – 77%, *score* 1 – 33%) e C (*score* 0 – 66%, *score* 1 – 34%), nos grupos B e B+L alguns espécimes chegaram a apresentar *score* 3 (B – 50%, B+L – 25%). Aos 30 dias a porcentagem de imunomarcação aumentou consideravelmente em todos os grupos, sendo o L o único a apresentar espécimes com *score* 0 (16%). Já aos 60 dias nenhum dos grupos apresentou *score* 0, o grupo C manteve-se no *score* 1, enquanto os outros grupos apresentaram maior porcentagem de imunomarcação do TRAP, sendo o grupo B+L a apresentar *score* 4 (68%), o grupo B teve os *scores* em sua maioria divididos entre 3 (50%) e 4 (34%), já no grupo L a maioria dos *scores* estavam em 1 (50%), seguido pelo *score* 4 (34%) e 3 (16%) (Figura 26c, 26d e 26e).

Figura 26 – Fotomicrografias da imunomarcacão para o biomarcador TRAP na região de osso neoformado dentro do defeito e Gráficos da porcentagem da imunomarcacão de TRAP presente no osso neoformado dentro do defeito cirúrgico nos tempos de 07, 30 e 60 dias



Legenda: a) Grupo L 30 dias – marca o intracelular em célula imunorreativa em tecido conjuntivo próximo ao osso neoformado, região de borda (aumento original X40). b) Grupo L 30 dias – marca o extracelular concentrada em borda de osso neoformado próximo   borda do defeito (aumento original X20). (→) célula/área imunorreativa, (*) osso neoformado. c) Gráfico TRAP-07d mostrando a distribui o dos Scores (em porcentagem) referente ao padrão de imunomarcacão; d) Gráfico TRAP-30d mostrando a distribui o dos Scores (em porcentagem) referente ao padrão de imunomarcacão; e) Gráfico TRAP-60d mostrando a distribui o dos Scores (em porcentagem) referente ao padrão de imunomarcacão.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a necessidade de aumento do tecido ósseo em cirurgias ósseas se tornou mais frequente, e a aplicação de enxertos para promover a regeneração do tecido vem tornando-se um procedimento de rotina, principalmente na presença de grandes defeitos ósseos (Elgali et al., 2013). Devido às limitações apresentadas para utilização do osso autógeno, vêm sendo desenvolvidos biomateriais como uma opção alternativa para enxerto ósseo além da aplicação de terapias para modulação do metabolismo ósseo.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com matriz óssea mineralizada de osso bovino e laser de baixa intensidade em única aplicação transoperatória por meio de estudo histomorfométrico e imunohistoquímico em ratos.

O Bio-Oss® vem sendo amplamente usado clinicamente e tem mostrado resultados promissores que chegam a ser comparáveis aos enxertos ósseos autógenos, e isso se deve a algumas de suas características como neoformação óssea adequada, baixa taxa de reabsorção, características osteocondutoras e compensação pela reabsorção óssea natural causada pela remodelação (Shamsoddin et al., 2019). Além disso ele é um dos materiais biocompatíveis sintéticos que mais se assemelham à hidroxiapatita do osso humano, e sua desproteinização, eliminação dos componentes orgânicos, é feita com tratamento com uma solução alcalina forte e sinterização a 3001°C (Tapety et al., 2004).

Por meio da microscopia eletrônica de varredura Fan et al. (2018) puderam observar que este xenoenxerto é disponível como granulado com tamanhos de partículas típicos de aproximadamente 1–2 mm, com ampliação de 5000x o Bio-Oss® mostra macrotopografia com macroporos interconectados,

em ampliação dobrada os autores puderam observar nanoestruturas pontilhadas, feitas de grânulos com um tamanho de quase 50–100 nm de diâmetro. A presença dessas micro e nanoestruturas são importantes devido ao aumento da área de superfície, que auxilia na adsorção de fatores de crescimento e proteínas que podem desencadear nova formação óssea (Fan et al., 2018). Tapety et al. (2004) concluíram que o Bio-Oss® representa uma excelente opção para enxerto ósseo, por promover atividade osteoblástica nos estágios iniciais da regeneração óssea.

Já a terapia de laser de baixa intensidade (LLLT) quando usada dentro dos parâmetros da chamada janela terapêutica (600-1100 nm) apresenta interações complexas com os tecidos biológicos de maneira geral, e é importante ressaltar que seu efeito biológico não ocorre apenas na superfície do tecido irradiado (da Fonseca et al., 2019).

Não está completamente esclarecido o mecanismo pelo qual a irradiação a laser age sobre as células, uma das teorias mais aceitas foi proposta por Karu (1999) e é denominada sinalização mitocondrial retrógrada (Freitas et al., 2016). A molécula ou parte da mesma que é capaz de absorver energia de um fóton de radiação é denominada cromóforo. Sugere-se que o cromóforo faça parte da estrutura da mitocôndria, sendo o citocromo c oxidase (Cox) considerado o principal fotoceptor. O Cox é uma enzima que pertence à cadeia respiratória e é responsável por mediar a transferência de elétrons do citocromo c para moléculas oxigênio (da Fonseca, 2018).

No tecido ósseo a LLLT parece agir de dois modos, por meio da estimulação da proliferação celular precursora de osteoblastos e pela estimulação posterior da diferenciação celular, aumentando o número de células osteoblásticas, com um aumento subsequente na formação óssea (Khadra et al., 2004).

Para este trabalho o protocolo de terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) foi escolhido com a intenção de estabelecer diretrizes para um protocolo transoperatório de uma única aplicação de laser em contato direto com a área da cirurgia, e pode confirmar os efeitos positivos de uma única sessão de irradiação no reparo ósseo do defeito, assim como Cunha et al. (2014) e Pretel et al. (2017).

A maior proporção de neoformação óssea (AN %) foi observada no grupo apenas irradiado por laser (L) e grupo controle (C), apesar da associação da terapia de laser de baixa intensidade com o Bio-Oss® (B+L) ter apresentado resultado superior ao grupo que recebeu apenas o biomaterial (B), os mesmos se apresentaram estatisticamente semelhantes, e estes dados puderam ser observados desde o período de 30 dias. Os valores médios de AN (%) apresentados pelo grupo B+L-30d foram aproximadamente um pouco mais do que o dobro do valor médio apresentado por B-30d. Estes dados estão parcialmente de acordo com os apresentados por Bosco et al. (2016), já que em seu estudo o grupo da associação entre biomaterial e laser chegou a apresentar diferença estatística significativa. Contudo, o dado do presente estudo é justificável, já que o uso de biomateriais osteocondutores pode induzir menos formação de tecido ósseo nas áreas enxertadas do que nas áreas não enxertadas, pois quando os biomateriais não são reabsorvidos, eles ocupam o espaço do novo osso (de Oliveira et al., 2018).

Rasouli et al. (2014) e Cunha et al. (2014) concluíram em seus trabalhos que a associação de LLLT e Bio-Oss® é superior tanto ao biomaterial quanto a LLLT utilizados separadamente. Assim como observado por Cunha et al. (2014), os dados do presente estudo sugerem que só a LLLT já seria benéfica na reparação da ferida cirúrgica seguindo-se este protocolo de aplicação, porém clinicamente, além da quantidade de novo osso formado, o volume tecidual é de

grande importância, por isso a necessidade de se avaliar cuidadosamente os resultados da associação entre LLLT e Bio-Oss® apresentados. Além disso, a LLLT pareceu acelerar o processo de reparação da ferida cirúrgica, apresentando em quase todos os parâmetros resultados superiores aos demais grupos a partir do período de 30 dias.

Apesar da menor proporção de neoformação óssea (AN%) ter sido apresentada pelos grupos B e B+L estes foram os grupos que apresentaram maior área total do defeito (AT mm²) aos 30 e 60 dias, logo seguidos pelo grupo L, estes dados apontam para a capacidade do biomaterial de preenchimento do defeito o que acaba sendo um importante parâmetro para prática clínica, Fabris et al. (2016) chegaram a uma conclusão parecida avaliando a eficácia de enxertos ósseos com LLLT.

A neoformação óssea apresentava-se em maioria na forma de osso lamelar (ANL%) localizado próximos à borda, esse mesmo padrão de neoformação óssea centrípeta foi observado por Bosco et al. (2016) e Fan et al. (2018), isso ocorre devido ao aporte sanguíneo, pois o reparo ósseo depende principalmente da disponibilidade de células precursoras osteogênicas no osso ou tecido mole circundante e também da capacidade dessas células de invadir o defeito e se diferenciar em osteoblastos (Rasouli et al., 2014).

As três medidas lineares referentes às distâncias remanescentes entre as bordas de osso neoformado nos dão outro parâmetro clínico importante, que é o de fechamento do defeito ósseo. Apesar de não ter diferenças estatísticas significativas entre as modalidades terapêuticas, pode-se observar que aos 60 dias todos os grupos apresentaram menores resultados se comparados aos apresentados em 07 dias, o que compete a um melhor fechamento do defeito independente da modalidade terapêutica escolhida. Nunes et al. (2019) já haviam demonstrado a eficiência da LLLT para esse parâmetro em ratos sob

efeito de nicotina, onde a LLLT chegou a compensar os efeitos negativos da nicotina no metabolismo ósseo.

Sabe-se que a LLLT cria condições ambientais que aceleram a cicatrização óssea estimulando a proliferação e diferenciação de osteoblastos *in vivo* e *in vitro*, o que levaria consequentemente a um aumento da formação óssea (de Freitas et al., 2016). A interação OPG/RANKL/RANK influencia diretamente o metabolismo e remodelação óssea que são essências para o processo de neoformação óssea e os marcadores RANKL e OPG vem sendo usados para avaliar a atividade osteoblástica (Kohli et al., 2011).

No presente estudo foi possível observar a imunomarcção para os biomarcadores OPG e RANKL a partir dos 7 dias, que se mantiveram presentes em todos os grupos nos períodos de 30 e 60 dias, o que está de acordo com o estudo de Hassumi et al. (2017), no qual foi possível observar marcação imunorreativa para OPG e RANKL a partir dos sete dias durante processo de cicatrização de alvéolo em ratos. No geral, os grupos que apresentaram maior expressão dos biomarcadores foram os grupos B e B+L, com exceção ao biomarcador RANKL aos 30 dias em que o grupo L teve maior expressão, esses dados podem ser explicados pela presença do Bio-Oss® que é um material osteocondutor, porém o mesmo não foi observado por van Houdt et al. (2015) com relação ao biomarcador de OPG em defeitos tratados em fêmur de ratos; os autores observaram aumento de expressão apenas de RANKL, van Houdt e colaboradores (2015) compararam a ação do Bio-Oss® com a do Biossilicato de vidro e este último apresentou aumento da expressão tanto de OPG quanto RANKL quando comparado ao grupo controle, com isso foi possível observar os efeitos positivos da utilização de enxertos ósseos para neoformação óssea.

As expressões de OPG e RANKL nos grupos irradiados com laser seguiram o mesmo padrão de aumento de expressão que os demais grupos, o que

está parcialmente em acordo com o observado por Rasouli et al. (2014) em seu estudo sobre a associação de LLLT e Bio-Oss® em defeitos de calvária de coelhos. No estudo de Rasouli e colaboradores (2014) foi observado maior aumento de OPG nos estágios iniciais o que levaria à inibição do RANKL e consequentemente o não amadurecimento dos osteoclastos, levando a mais formação óssea; porém o observado no presente estudo foi a estimulação celular generalizada por parte da LLLT, o mesmo ocorreu no estudo de Tim et al. (2014), no qual pode ser observado presença de marcação para RANKL em todos os tempos de reparação óssea da mesma forma que nos grupos controle.

Os osteoclastos desempenham um papel significativo no processo de remodelação óssea e no interior de seu citoplasma contém múltiplos vacúolos com manchas positivas para a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), portanto a coloração TRAP é aplicada em estudos de imunohistoquímica para avaliar a atividade osteoclástica (Tim et al., 2014).

O período que apresentou menor porcentagem de imunomarcação para o biomarcador TRAP foi de 07 dias, aos 30 e 60 dias foi possível observar aumento gradual de sua porcentagem. O grupo controle foi o que apresentou menor *score* de marcação aos 60 dias, e os grupos que apresentaram maior *score* foram os grupos que receberam biomaterial, dado semelhante a este foi apresentado por Fabris et al. (2016) onde concluíram que o biomaterial utilizado, no caso o *Boneceramic*, permaneceu sendo reabsorvido e, portanto, retardou a reparação óssea. A presença de marcação imunorreativa para TRAP em todos os tempos observados pode ser explicada pelo estudo de Fan et al. (2018), quando comparando diferentes tipos de enxerto foi possível observar a presença da imunomarcação para TRAP após 30 e 60 dias; segundo os autores essa imunomarcação para TRAP no estágio inicial se daria devido a reação inflamatória que desempenha um papel na promoção de nova formação óssea.

No estágio intermediário, quando já há neoformação óssea, a formação óssea e a reabsorção ocorreram simultaneamente.

Dos três biomarcadores analisados no presente estudo, o TRAP foi o que teve menor frequência de imunomarcção aos 07 dias. A remodelação é um processo essencial para a maturação do osso que se forma precocemente durante a reparação; no entanto, esse processo é tradicionalmente considerado um estágio de maturação tardia, que ocorre ao longo de várias semanas (Elgali et al., 2014), o que explica sua maior porcentagem de imunomarcção para TRAP aos 30 e 60 dias no presente estudo. No presente estudo, a porcentagem de imunomarcção para OPG e RANKL se demonstrou maior nos grupos B e B+L, possivelmente, este dado apresentado se deve à presença do biomaterial que tem sido ligado à maior expressão dos genes para diferenciação de células do metabolismo ósseo (van Houdt et al., 2015). Os *scores* de imunomarcção para OPG e RANKL apresentados pelos grupos B e B+L sugerem que a presença do Bio-Oss® induziu uma ossificação controlada nos defeitos ósseos cirúrgicos.

Os estudos utilizados para discussão do presente estudo utilizaram protocolos de LLLT diferentes, portanto é complexo comparar os resultados de estudos envolvendo LLLT na literatura devido à grande variedade de protocolos utilizados (Nicola et al., 2004). Mais estudos *in vivo* são necessários para padronização de protocolos incluindo dose e número de aplicações da LLLT em associação aos biomateriais, desse modo, futuramente será possível a transposição clínica dos resultados.

6 CONCLUSÃO

Aos 30 dias, os grupos que apresentaram maior proporção de neoformação foram os grupos L e C, apesar de não haver diferença estatística significativa entre os grupos B e B+L, o grupo B+L apresentou mais que o dobro de proporção de neoformação que o grupo B. Em 60 dias, os maiores valores relacionados ao volume ósseo foram encontrados nos grupos B e B+L. Todos os grupos apresentaram menores valores referente a distância entre as bordas de osso neoformado no interior do defeito ao final do experimento.

Os grupos B e B+L apresentaram os maiores *scores* de imunomarcacão para OPG e RANKL, em 60 dias. As imunomarcacões para TRAP aparecem mais tardiamente no grupo L, demonstrando possível associaão da terapia de laser de baixa intensidade com um metabolismo ósseo positivo com apenas uma aplicacão única durante procedimento cirúrgico.

REFERÊNCIAS*

- Bosco AF, Faleiros PL, Carmona LR, Garcia VG, Theodoro LH, de Araujo NJ, et al. Effects of low-level laser therapy on bone healing of critical-size defects treated with bovine bone graft. *J Photochem Photobiol B*. 2016 Oct;163:303-10. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.040. Epub 2016 Aug 31.
- Brasilino MDS, Stringhetta-Garcia CT, Pereira CS, Pereira AAF, Stringhetta K, Leopoldino AM, et al. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves bone formation in the alveolar socket healing after tooth extraction in rats. *Clin Oral Investig*. 2018 Apr;22(3):1449-61. doi: 10.1007/s00784-017-2249-1. Epub 2017 Oct 14.
- Buduneli E, Vardar-Sengül S, Buduneli N, Atilla G, Wahlgren J, Sorsa T. Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1, and Laminin-5 g2 Chain Immunolocalization in Gingival Tissue of Endotoxin-Induced Periodontitis in Rats: Effects of Low-Dose Doxycycline and Alendronate. *J Periodontol*. 2007 Jan;78(1):127-34.
- Calixto JC, Lima CE, Frederico L, Lima RP, Anbinder AL. The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2011 Apr;39(3):215-20.
- Chaushu G, Mardinger O, Calderon S, Moses O, Nissan J. The use of cancellous block allograft for sinus floor augmentation with simultaneous implant placement in the posterior atrophic maxilla. *J Periodontol*. 2009 Mar;80(3):422-8.
- Cunha MJ, Esper LA, Sbrana MC, de Oliveira PG, do Valle AL, de Almeida AL. Effect of lowlevel laser on bone defects treated with bovine or autogenous bone grafts: in vivo study in rat calvaria. *Biomed Res Int*. 2014;2014:104230. doi: 10.1155/2014/104230. Epub 2014 May 28.
- da Fonseca AS. Is there a measure for low power laser dose? *Lasers Med Sci*. 2019 Feb;34(1):223-234. doi: 10.1007/s10103-018-2676-5.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

de Oliveira JM, de Moraes RO, Gusman DJ, Faleiros PL, Nagata MJ, Garcia VG, et al. Influence of low-level laser therapy on the healing process of autogenous bone block grafts in the jaws of systemically nicotine-modified rats: A histomorphometric study. *Arch Oral Biol*. 2017 Mar;75:21-30. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.12.003. Epub 2016 Dec 5.

de Oliveira GJPL, Aroni MAT, Medeiros MC, Marcantonio E Jr, Marcantonio RAC. Effect of low-level laser therapy on the healing of sites grafted with coagulum, deproteinized bovine bone, and biphasic ceramic made of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate. In vivo study in rats. *Lasers Surg Med*. 2018 Jan 13. doi: 10.1002/lsm.22787.

Diniz JS, Nicolau RA, de Melo Ocarino N, do Carmo Magalhães F, de Oliveira Pereira RD, et al. Effect of low-power gallium-aluminum-arsenium laser therapy (830 nm) in combination with bisphosphonate treatment on osteopenic bone structure: an experimental animal study. *Lasers Med Sci*. 2009 May;24(3):347-52.

Dörtbudak O, Haas R, Mailath-Pokorny G. Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. *Clin Oral Implants Res*. 2002 Jun;13(3):288-92.

Elgali I, Igawa K, Palmquist A, Lennerås M, Xia W, Choi S, et al. Molecular and structural patterns of bone regeneration in surgically created defects containing bone substitutes. *Biomaterials*. 2014 Mar;35(10):3229-42. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.084. Epub 2014 Jan 15.

Fabris ALDS, Faverani LP, Gomes-Ferreira PHS, Polo TOB, Santiago-Júnior JF, Okamoto R. Bone repair access of BoneCeramic™ in 5-mm defects: study on rat calvaria. *J Appl Oral Sci*. 2018 Jan 15;26:e20160531. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0531.

Fan YP, Lu JF, Xu AT, He FM. Physiochemical characterization and biological effect of anorganic bovine bone matrix and organic-containing bovine bone matrix in comparison with Bio-Oss in rabbits. *J Biomater Appl*. 2018 Oct;33(4):566-575. doi: 10.1177/0885328218804926

Fangel R, Bossini PS, Renno AC, Ribeiro DA, Wang CC, Toma RL, et al. Low-level laser therapy, at 60 J/cm² associated with a Biosilicate(®) increase in bone deposition and indentation biomechanical properties of callus in osteopenic rats. *J Biomed Opt*. 2011 Jul;16(7):078001.

Fernandes KR, Magri AMP, Kido HW, Parisi JR, Assis L, Fernandes KPS, et al. Biosilicate/PLGA osteogenic effects modulated by laser therapy: *In*

vitro and *in vivo* studies. J Photochem Photobiol B. 2017;173:258-65.
doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.06.002.

Freitas NR, Guerrini LB, Esper LA, Sbrana MC, Dalben GDS, Soares S, et al. Evaluation of photobiomodulation therapy associated with guided bone regeneration in critical size defects. *In vivo* study. J Appl Oral Sci. 2018;26:e20170244. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0244. Epub 2018 May 7.

Galindo-Moreno P, Avila G, Fernández-Barbero JE, Aguilar M, Sánchez-Fernández E, Cutando A, et al. Evaluation of sinus floor elevation using a composite bone graft mixture. Clin Oral Implants Res. 2007 Jun;18(3):376-82.

Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Höfling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. J Photochem Photobiol B. 2003 May-Jun;70(2):81-9.

Hassumi JS, Mulinari-Santos G, Fabris ALDS, Jacob RGM, Gonçalves A, Rossi AC, et al. Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis. J Appl Oral Sci. 2018 Jun 18;26:e20170326. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0326.

Iezzi G, Scarano A, Mangano C, Cirotti B, Piattelli A. Histologic results from a human implant retrieved due to fracture 5 years after insertion in a sinus augmented with anorganic bovine bone. J Periodontol. 2008 Jan;79(1):192-8.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible or near-TI radiation on cells. J Photochem Photobiol B. 1999 Mar;49(1):1-17.

Khadra M, Kasem N, Haanaes HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004 Jun;97(6):693-700.

Khoury RK, Brown DM, Koudsi B, Deune EG, Gilula LA, Cooley BC, et al. Repair of calvarial defects with flap tissue: role of bone morphogenetic proteins and competent responding tissues. Plast Reconstr Surg. 1996 Jul;98(1):103-9.

Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: Reporting *in vivo* experiments: The ARRIVE guidelines. Br J Pharmacol. 2010 Aug;160(7):1577-9. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x.

Klijn RJ, Meijer GJ, Bronkhorst EM, Jansen JA. A meta-analysis of histomorphometric results and graft healing time of various biomaterials compared to autologous bone used as sinus floor augmentation material in humans. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010 Oct;16(5):493-507.

Kohli SS, Kohli VS. Role of RANKL–RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. *Indian J Endocrinol Metab.* 2011 Jul;15(3):175-81. doi: 10.4103/2230-8210.83401.

Marques L, Holgado LA, Francischone LA, Ximenez JP, Okamoto R, Kinoshita A. New LLLT protocol to speed up the bone healing process-histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. *Lasers Med Sci.* 2015 May;30(4):1225-30. doi: 10.1007/s10103-014-1580-x.

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

Messora MR, Nagata MJ, Dornelles RC, Bomfim SR, Furlaneto FA, de Melo LG, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res.* 2008 Dec;43(6):723-9.

Mokbel N, Bou Serhal C, Matni G, Naaman N. Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. *Oral Maxillofac Surg.* 2008 Jul;12(2):73-8. doi: 10.1007/s10006-008-0107-7.

Muniz Renno AC, de Moura FM, dos Santos NS, Tirico RP, Bossini PS, Parizotto NA. The effects of infrared-830 nm laser on exercised osteopenic rats. *Lasers Med Sci.* 2006 Dec;21(4):202-7.

Nagata MJ, Santinoni CS, Pola NM, de Campos N, Messora MR, Bomfim SR, et al. Bone marrow aspirate combined with lowlevel laser therapy: a new therapeutic approach to enhance bone healing. *J Photochem Photobiol B.* 2013 Apr 5;121:6-14.

Nicola RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MT, dos Reis LM, Zângaro RA. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci.* 2003;18(2):89-94.

Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Binderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *J Oral Rehabil*. 2006 Aug;33(8):619-924.

Nunes CMM, Ferreira CL, Bernardo DV, Oblack GB, Longo M, Santamaria MP, et al. The influence of LLLT applied on applied on calvarial defect in rats under effect of cigarette smoke. *J Appl Oral Sci*. 2019 Jun 13;27:e20180621. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0621.

Oliveira P, Ribeiro DA, Pipi EF, Driusso P, Parizotto NA, Renno AC. Low level laser therapy does not modulate the outcomes of a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate) on bone consolidation in rats. *J Mater Sci Mater Med*. 2010 Apr;21(4):1379-84.

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

Pinheiro AL, Soares LG, Cangussú MC, Santos NR, Barbosa AF, Silveira Júnior L. Effects of LED phototherapy on bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: a Raman spectroscopic study. *Lasers Med Sci*. 2012 Sep;27(5):903-16.

Pretel H, Lizarelli RF, Ramalho LT. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. *Lasers Surg Med*. 2017 Dec;39(10):788-96.

Rasouli Ghahroudi AA, Rokn AR, Kalhori KA, Khorsand A, Pournabi A, Pinheiro AL, et al. Effect of low-level laser therapy irradiation and Bio-Oss graft material on the osteogenesis process in rabbit calvarium defects: a double blind experimental study. *Lasers Med Sci*. 2014 May;29(3):925-32. doi: 10.1007/s10103-013-1403-5. Epub 2013 Aug 31.

Renno AC, McDonnell PA, Crovace MC, Zanotto ED, Laakso L. Effect of 830 nm laser phototherapy on osteoblasts grown in vitro on Biosilicate scaffolds. *Photomed Laser Surg*. 2010 Feb;28(1):131-3.

Rokn AR, Khodadoostan MA, Ghahroudi AAR, Motahhary P, Fard MJK, De Bruyn H, et al. Bone Formation with Two Types of Grafting Materials: A Histologic and Histomorphometric Study. *Open Dent J*. 2011;5:96-104. doi: 10.2174/1874210601105010096.

Rosa CB, de Castro IC, Júnior JA, Aragão JS, Barbosa AF, Silveira L Jr, et al. The efficacy of the use of IR laser phototherapy (LPT) on bone defect grafted with biphasic ceramic on rats with iron deficiency anemia: Raman spectroscopy analysis. *Lasers Med Sci.* 2014 May;29(3):1251-9.

Shamsoddin E, Houshmand B, Golabgiran M. Biomaterial selection for bone augmentation in implant dentistry: A systematic review. *J Adv Pharm Technol Res.* 2019 Apr-Jun;10(2):46-50. doi: 10.4103/japtr.JAPTR_327_18. Review.

Sbordone L, Toti P, Menchini-Fabris G, Sbordone C, Guidetti F. Implant success in sinus-lifted maxillae and native bone: a 3-year clinical and computerized tomographic follow-up. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009 Mar-Apr;24(2):316-24.

Schlegel AK, Donath K. BIO-OSS--a resorbable bone substitute? *J Long Term Eff Med Implants.* 1998;8(3-4):201-9.

Schlegel KA, Lang FJ, Donath K, Kulow JT, Wiltfang J. The monocortical critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Jul;102(1):7-13.

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

Sella VR, do Bomfim FR, Machado PC, da Silva Morsoleto MJ, Chohfi M, Plapler H. Effect of low-level laser therapy on bone repair: a randomized controlled experimental study. *Lasers Med Sci.* 2015 Apr;30(3):1061-8. doi: 10.1007/s10103-015-1710-0.

Springfield DS. Autogenous bone grafts: nonvascular and vascular. *Orthopedics.* 1992 Oct;15(10):1237-41.

Stavropoulos A, Kostopoulos L, Nyengaard JR, Karring T. Deproteinized bovine bone (Bio-Oss) and bioactive glass (Biogran) arrest bone formation when used as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR): an experimental study in the rat. *J Clin Periodontol.* 2003 Jul;30(7):636-43.

Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2005 Apr;23(2):161-6.

Tapety FI, Amizuka N, Uoshima K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Jun;15(3):315-24.

Tim CR, Pinto KN, Rossi BR, Fernandes K, Matsumoto MA, Parizotto NA, et al. Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. *Lasers Med Sci.* 2014 Jan;29(1):147-56. doi: 10.1007/s10103-013-1302-9. Epub 2013 Mar 21.

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

van Houdt CI, Tim CR, Crovace MC, Zanotto ED, Peitl O, Ulrich DJ, et al. Bone regeneration and gene expression in bone defects under healthy and osteoporotic bone conditions using two commercially available bone graft substitutes. *Biomed Mater.* 2015 May 8;10(3):035003. doi: 10.1088/1748-6041/10/3/035003.

Yaoita H, Orimo H, Shirai Y, Shimada T. Expression of bone morphogenetic proteins and rat distal-less homolog genes following rat femoral fracture. *J Bone Miner Metab.* 2000;18(2):63-70.

ANEXO A – Certificado CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICAMOS, que a proposta intitulada **Avaliação do reparo ósseo de defeitos críticos tratados com matriz óssea mineralizada de osso bovino (Bio-Oss®) e laser de baixa intensidade – Estudo histomorfométrico e imunohistoquímico em ratos** registrada com o nº **002 /2016-CEUA-ICT-UNESP**, sob a responsabilidade do Profa. Dra. **ANDREA CARVALHO DE MARCO**, tendo como colaboradora a Profa. Dra. **MARIA APARECIDA NEVES JARDINI**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP)**, em reunião de 10/06/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/07/2016 a 31/06/2018
Espécie/linhagem/raça	Rato norvegicus, albinus/wistar
Nº de Animais	48
Peso/Idade	300 grs/90 dias
Sexo	macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP


Profa. Dra. CRISTIANE YUMI KOGA ITO
Vice-Coordenadora em exercício

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9076
Fax (12) 3947-9010 / guedes@fosjc.unesp.br/komori@fosjc.unesp.br



**CEUA - Comissão de Ética no
Uso de Animais**

São José dos Campos, 19 de SETEMBRO de 2018

OFÍCIO Nº 12/2018-CEUA-ICT-CSJC-UNESP

Prezado(a)	ANDREA CARVALHO DE MARCO
Projeto	Avaliação do reparo ósseo de defeitos críticos tratados com matriz óssea mineralizada de osso bovino (Bio-Oss® e laser de baixa intensidade. Estudo histomorfométrico e imunohistoquímico em ratos.
Parecer	PROTOCOLO nº 02/2016 – Foi aprovado a alteração dos números de animais inicialmente proposto, sendo incluídos mais 24 ratos wistar, para o desenvolvimento da pesquisa.



Profa.Dra PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO
COORDENADORA

