



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada

Ana Flávia Piquera Santos

**Avaliação do processo de reparo alveolar em
ratos utilizando β - tricálcio-fosfato associado
ou não ao LASER de baixa potência**

Araçatuba- SP

2020

Ana Flávia Piquera Santos

**Avaliação do processo de reparo alveolar em
ratos utilizando β - tricálcio-fosfato associado
ou não ao LASER de baixa potência**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia do Campus de Araçatuba –
Unesp, para a obtenção do Grau de
“Mestre em Odontologia” – Área de
Concentração Implantodontia

Orientador: Prof. Ass. Dr. Francisley Ávila
Souza
Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Helena
Penha de Oliveira

Araçatuba- SP

2020

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S237a Santos, Ana Flávia Piquera.
Avaliação do processo de reparo alveolar em ratos utilizando β -tricálcio fosfato associado ou não ao LASER de baixa potência / Ana Flávia Piquera Santos. - Araçatuba, 2020
68 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Francisley Ávila Souza
Coorientadora: Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Terapia com luz de baixa intensidade 2. Materiais biocompatíveis 3. Cirurgia bucal 4. Análise biológica I. T.

Black D7
CDD 617.64

Dedicatória

Dedico:

À meus pais, por todo esforço que fizeram para me ajudar, por todo carinho, amor, estrutura emocional, compreensão e suporte que me forneceram durante essa fase e ainda fornecem. Muito obrigada por todo apoio que me dão!

À minha avó Clarisse, por tudo o que fez e tem feito por mim, por toda atenção, carinho, compreensão e amor.

Agradecimentos
Especiais

Agradecimentos Especiais

Agradeço primeiramente à **Deus**, por ter permitido que chegasse até aqui, por todas as bênçãos a mim fornecidas, por ter me dado forças todo tempo, pela proteção, por ter colocado pessoas tão maravilhosas em meu caminho, por estar comigo em todos os momentos, me ajudando a superar os obstáculos e me guiando o tempo todo. Obrigada meu Deus por tudo!

À meus pais, **Branca e Laércio**. Eu posso passar a vida toda tentando, mas nunca vou conseguir retribuir tudo o que vocês fizeram e tem feito por mim. Sei que não foi fácil para vocês, sei que fizeram de tudo para que eu pudesse me formar e continuaram me apoiando durante esses 2 anos de mestrado. Além da graduação, passar mais 24 meses sem ter bolsa de mestrado foi um desafio tanto pra vocês quanto para mim, mas vocês nunca me deixaram na mão, nunca permitiram que me faltasse nada, seja financeiramente ou emocionalmente. Sempre que precisei vocês estavam ali, prontos para me ajudar a superar qualquer problema, sempre me ouvindo reclamar das coisas que estavam acontecendo, sempre me dando conselhos ou até mesmo broncas que, cá entre nós, foram bem merecidas. Eu só sou o que sou graças a vocês. Obrigada por serem pais maravilhosos! Obrigada por estarem sempre comigo, nunca deixando faltar nada- amor, carinho, companheirismo. Obrigada por serem os melhores pais e amigos que eu poderia ter na minha vida. Todas as minhas vitórias foram e serão vitórias de vocês! Amo vocês!!

À minha avó, **Clarisse**, minha segunda mãe, que sempre esteve comigo, me apoiando, me ajudando e me ensinando. Muito obrigada por tudo que fez e continua fazendo por mim, por todo carinho, amor, atenção e companheirismo. A senhora e

meus pais, são as pessoas mais importantes da minha vida e eu só tenho a agradecer.

Aos meus falecidos avôs e avó, **Antônio, Pedro e Aparecida** (*in memoriam*), que, por mais que não estejam comigo há muitos anos, participaram efetivamente da minha educação quando criança, estando sempre presentes e fazendo de tudo por mim. Lembro de vocês a todo momento. Só Deus sabe a falta que vocês fazem e sei que se estivessem aqui, estariam muito orgulhosos de mim! Parte de mim acredita que vocês estão comigo, como meus anjos mais que especiais, observando e guiando meus passos. Amo vocês eternamente.

Aos meus tios, **Sinezia e Antônio**, vocês estão mais próximos (em Km) a mim do que meus pais e sempre disseram que poderia contar com vocês para o que precisasse. Só tenho a agradecer por tudo o que fizeram por mim e por estarem sempre presentes.

À minha **família**, que, por mais que tenha mais contato com alguns do que com outros, sei que posso contar com todos vocês. Obrigada por todo apoio, carinho e atenção!!

Ao meu orientador, **Prof. Francisley**, pela confiança depositada a mim, por toda ajuda, compreensão e paciência, desde 2015, quando me ofereceu um projeto de iniciação científica. Foi graças à iniciação científica que decidi fazer mestrado e devo tudo ao senhor, professor. Muito obrigada por estar presente, principalmente quando mais precisei e nos momentos de desespero. Obrigada por estar disposto a fazer de tudo para ajudar seus orientados, pelo altruísmo e preocupação conosco. Se cheguei até aqui hoje, foi graças ao senhor e ao nosso grupo de pesquisa, que o senhor sempre incentivou. Obrigada por toda paciência que tem demonstrado comigo, me socorrendo nos momentos de aflição, agitação e pequenos surtos,

sempre com muita calma e tentando controlar a situação me mostrando o lado positivo de tudo. O senhor é uma pessoa maravilhosa, um exemplo de humanidade e respeito.

Aos meus amigos de Ilha Solteira, especialmente à **Karol**, uma amiga de infância, que esteve comigo em todos os momentos. Muito obrigada pela sua amizade, você é muito especial para mim. Sei que posso contar com você pra qualquer coisa, assim como pode contar comigo. Obrigada!

À minhas companheiras de apartamento, **Aretuza, Thais Cougo e Larissa**, que estão comigo desde a graduação e sempre estiveram comigo em todos os momentos. Obrigada pelo companheirismo, por me aturarem todos esses anos, pela paciência, e pela amizade de vocês. O “Apartamento 31” vai ficar pra sempre na memória, guardado com muito carinho.

À todos os amigos que fiz durante esses dois anos de mestrado, **Bruna, Carol, Bruno, Laís Egas, Kim, Leonardo e Vinicius**. Não consigo imaginar todos esses meses de mestrado sem vocês. O apoio, a presença e o companheirismo de vocês foram fundamentais. “Não há solidão mais triste do que a do homem sem amizades. A falta de amigos faz com que o mundo pareça um deserto”- Francis Bacon.

Ao nosso grupo de pesquisa, **Henrique, Luara, Lara, Laís Kawamata, Lia e Rodrigo**, vocês foram fundamentais nessa jornada. Sem o apoio e a ajuda de vocês todo esse processo seria mais lento. Além disso, os momentos juntos, a amizade que foi sendo desenvolvida ao longo do tempo foi muito importante para mim. Vocês são importantes para mim. Cada um com seu jeitinho diferente de lidar com as coisas, a habilidade que desenvolvemos em trabalhar em grupo, a parceria entre nós, tudo isso contribuiu para o que somos hoje. E não só na faculdade, mas fora

também. Só tenho a agradecer a vocês por tudo. “A amizade pode existir entre as pessoas mais desiguais. Ela as torna iguais” - Aristóteles.

À minha coorientadora, **Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira**, que sempre esteve presente quando precisei, que me ajudou e abriu as portas da sala dela, sendo de outro departamento, para auxiliar na elaboração e desenvolvimento do meu projeto de pesquisa. Obrigada por todas as dicas e conselhos, por todo apoio, pela educação e carinho que teve comigo. A senhora é uma pessoa maravilhosa e merece todo meu respeito e gratidão.

À Profa. **Roberta Okamoto**, por ter aceito o convite para ser banca do meu EGQ e da defesa da dissertação. A senhora sempre me recebeu de braços abertos no departamento de Ciências Básicas, disposta a ajudar no que fosse preciso e sou muito grata a tudo que fez por mim. Sua habilidade em analisar tudo de maneira minuciosa me ajudou muito a melhorar o projeto da qualificação. Obrigada por toda bondade e gentileza que a senhora tem, por tratar os alunos sempre com muita educação e carinho.

À Profa. **Thallita Pereira Queiroz**, por ter aceito o convite para ser banca da defesa de dissertação. Infelizmente não tivemos muito contato, porém sempre ouço falarem da senhora com muito carinho e admiração. Tenho certeza que tenho muito a aprender com a senhora.

Ao Professor **André Luis da Silva Fabris**, pela disponibilidade em ser banca da dissertação e por toda ajuda e confiança depositada a mim durante as semanas que acompanhei os plantões CTBMF sob sua supervisão.

Às professoras **Ana Paula Farnezi Bassi e Daniela Ponzoni**, que sempre estiveram presentes no departamento, acessíveis e dispostas a fazer o que fosse preciso para ajudar os alunos, independentemente de serem orientados ou não.

Obrigada pelo apoio nas clínicas da pós-graduação e nos atendimentos no 10A. Eu triava pacientes com casos diferentes, muitas vezes complexos e vocês sempre me socorriam, me ajudavam no diagnóstico, plano de tratamento e me auxiliavam durante os procedimentos. Estiveram sempre presentes, até mesmo nos meus momentos de desespero, andando nos corredores do departamento, chorando ou extremamente agitada. Todo conhecimento e apoio que me deram foram fundamentais nesta caminhada. Que toda bondade existente nesses corações seja retribuída em bondade em dobro, muito amor e uma infinidade de coisas boas.

Ao Promovi, mais especificamente à psicóloga **Mariana**, que me acompanhou durante esses dois anos de mestrado, me ajudando a manter a calma e me dando todo suporte necessário para continuar. Você foi muito importante nessa etapa da minha vida. Me ajudou a descobrir muita coisa sobre mim e me fez acreditar mais na minha capacidade. Muito obrigada, Mari!

Ao **Fábio de Souza Batista**, por toda ajuda durante as cirurgias dos animais, por toda atenção e cuidado. Muito obrigada por ter aceito participar desta pesquisa e por ter nos ensinado a trabalhar com alvéolo de ratos.

À **Leticia Pitol Palin**, agradeço de coração por ter me ajudado a delinear esse estudo, contribuindo com a metodologia.

À todos os **colegas de mestrado e doutorado** do departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, que, por mais que exista graus diferentes de amizade, estamos sempre juntos no departamento, procurando ajudar uns aos outros e manter o ambiente mais leve e agradável. Muito obrigada por estarem lá sempre que precisei.

Aos professores de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial e Implantodontia, **Leonardo Perez Faverani**, **Idelmo Rangel Garcia Júnior**, **Osvaldo Magro Filho** e **Alessandra Marcondes Aranega**. A disponibilidade que vocês tem

para ajudar nós, alunos, tanto de pós-graduação quanto de graduação, á vontade e habilidade de transmitir conhecimento, e o fato de estarem sempre presentes e acessíveis a nós faz com que a disciplina, o departamento, seja tão forte e o ambiente de trabalho seja agradável. Muito obrigada por toda atenção e por estarem sempre presentes, dispostos a ajudar no que for necessário.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente com o desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimientos

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba** – FOA/Unesp, na pessoa do diretor **Prof. Titular Glauco Issamu Miyahara**, pela oportunidade de cursar a graduação e pós-graduação em uma universidade de excelência, bem estruturada e com profissionais de qualidade.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” com o atual Coordenador **Prof. Associado André Luiz Fraga Briso**.

Aos **funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP** pela disponibilidade, paciência e gentileza em todas as etapas do mestrado. Agradeço por toda ajuda que me forneceram durante esses 2 anos.

Aos **funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP** por ajudarem sempre que necessário, por toda paciência e gentileza.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada (**Paulo Gratão, Renato e Marco**). Só tenho a agradecer à vocês pelo carinho, atenção, por tudo que fizeram pra me ajudar e por tornarem o ambiente de trabalho sempre agradável. Muito obrigada por toda paciência que tiveram comigo e por ensinar os procedimentos laboratoriais com tanta eficiência e calma.

À técnica de laboratório, **Dirce**, não sei como agradecer a você por tudo que fez para me ajudar, por transmitir a mim o conhecimento e técnicas para confecção das lâminas, com tanta paciência e atenção. Muito obrigada pelo carinho.

Ao **Laboratório para Estudo de Tecidos Mineralizados da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, na pessoa da **Profa. Dra. Roberta Okamoto**, por permitir a utilização do microscópio óptico para a captura das imagens das lâminas deste estudo e por todo suporte fornecido.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP**, pelo financiamento da minha pesquisa de iniciação científica (processo nº 2016/05264-4).

Ao **Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais- CNPEM, Laboratório LNNano**, por proporcionar a realização da análise por Microtomografia em um laboratório bem estruturado e organizado. Agradeço especialmente à Dra. Bruna Pomin Massucato e à Dra. Rubia Figueredo Gouveia por toda atenção,

paciência e por toda ajuda que forneceram, tanto na fase de submissão da proposta e agendamento, quanto nos dias das análises. Muito obrigada por tudo.

Aos **pacientes**, pela credibilidade e confiança depositadas a nós pós-graduandos, permitindo-nos aprimorar as habilidades cirúrgicas e a empatia. Minha eterna gratidão.

Epígrafe

“Seu trabalho vai ocupar uma grande parte da sua vida. A única maneira de estar verdadeiramente satisfeito é fazendo aquilo que você acredita ser um ótimo trabalho. E o único jeito de fazer um ótimo trabalho é fazendo algo que você ama.”

Steve Jobs

Santos AFP. Avaliação do processo de reparo alveolar em ratos utilizando β -Tricálcio-Fosfato associado ou não ao LASER de baixa potência [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2020.

RESUMO

O uso de biomateriais em substituição ao enxerto autógeno tem sido objeto de estudo, e apresentando resultados promissores. Deste modo, o objetivo desse estudo foi verificar os efeitos do β -tricálcio-fosfato e do LASER de baixa potência no processo de reparo alveolar. Foram utilizados 96 ratos (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), sendo 24 ratos para análise dos cortes calcificados e 72 ratos para análise dos cortes descalcificados. Os animais foram submetidos a exodontia do incisivo superior direito e em seguida foi feita a separação por grupo e por tempo. Para os cortes calcificados, foi feita a divisão em 4 grupos de 6 animais cada: Grupo CO (Controle), Grupo BTF (Biomaterial), Grupo LS (LASER de baixa potência), Grupo BTFL (biomaterial LASER de baixa potência), eutanasiados no período de 28 dias. Para análise dos cortes descalcificados foram utilizados os mesmos grupos em tempos de eutanasia de 7, 14 e 28 dias. As maxilas foram removidas e submetidas às análises histológica e histométrica nos cortes descalcificados e análise tomográfica microcomputadorizada (Micro-Ct) nos cortes calcificados. A análise por micro-Ct evidenciou formação de tecido ósseo em todos os grupos, porém não houve diferença entre os grupos experimentais e o controle. A análise histométrica evidenciou maior presença de tecido ósseo neoformado estatisticamente significativa em LS aos 7 dias quando comparados aos demais grupos. Desta forma, concluiu-se que o LASER de baixa potência acelerou as fases iniciais do processo de reparo alveolar.

Palavras-chave: Terapia com Luz de Baixa Intensidade. Materiais Biocompatíveis. Cirurgia Bucal. Análise Biológica.

Santos AFP. Evaluation of the alveolar repair process in rats using β -Tricalcium Phosphate associated or not with low power LASER [dissertation]. São Paulo State University, School of dentistry, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

The use of biomaterials to replace autogenous grafts has been the subject of study, and has shown promising results. Thus, the objective of this study was to verify the effects of β -tricalcium-phosphate and low-power LASER on the alveolar repair process. 96 rats (*Rattus norvegicus albinus* Wistar) were used, being 24 rats for analysis of calcified cuts and 72 rats for analysis of decalcified cuts. The animals underwent extraction of the upper right incisor and then the separation was made by group and by time. For the calcified cuts, the division was made into 4 groups of 6 animals each: Group CO (Control), Group BTF (Biomaterial), Group LS (low power LASER), Group BTFL (low power LASER biomaterial), euthanized in the 28-day period. For the analysis of decalcified cuts, the same groups were used at times of euthanasia of 7, 14 and 28 days. The jaws were removed and subjected to histological and histometric analysis in the decalcified sections and microcomputerized tomographic analysis (Micro-Ct) in the calcified sections. Micro-Ct analysis showed bone tissue formation in all groups, but there was no difference between experimental and control groups. Histometric analysis showed a greater presence of statistically significant neoformed bone tissue in LS at 7 days when compared to the other groups. Thus, it was concluded that the low-power LASER accelerated the early stages of the alveolar repair process.

Keywords: Low intensity light therapy. Biocompatible materials. Oral surgery. Biological analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma dos grupos experimentais	32
Figura 2. Microtomografia computadorizada CO. (A,B,C,D) cortes axiais em 2D (A), e tridimensionais sem escala de cor (B), com escala de cor “Bone” (C) e com escala de cor “Trabecular” (D). (E,F,G,H) cortes coronais em 2D (E), e tridimensionais sem escala de cor (F), com escala de cor “Bone” (G) e com escala de cor “Trabecular” (H). Setas vermelhas indicam paredes do alvéolo; Setas amarelas indicam áreas de tecido mais densas; e, Setas verdes indicam incisivo central do lado esquerdo	38
Figura 3. Microtomografia computadorizada BTF. (A,B,C,D) cortes axiais em 2D (A), e tridimensionais sem escala de cor (B), com escala de cor “Bone” (C) e com escala de cor “Trabecular” (D). (E,F,G,H) cortes coronais em 2D (E), e tridimensionais sem escala de cor (F), com escala de cor “Bone” (G) e com escala de cor “Trabecular” (H). Setas vermelhas indicam paredes do alvéolo; Setas amarelas indicam áreas de tecido mais densas; Setas verdes indicam incisivo central do lado esquerdo; e, Setas pretas indicam possíveis áreas de biomaterial remanescente	39
Figura 4. Microtomografia computadorizada LS. (A,B,C,D) cortes axiais em 2D (A), e tridimensionais sem escala de cor (B), com escala de cor “Bone” (C) e com escala de cor “Trabecular” (D). (E,F,G,H) cortes coronais em 2D (E), e tridimensionais sem escala de cor (F), com escala de cor “Bone” (G) e com escala de cor “Trabecular” (H). Setas vermelhas indicam paredes do alvéolo; Setas amarelas indicam áreas de tecido mais densas; e, Setas verdes indicam incisivo central do lado esquerdo	40

Figura 5. Microtomografia computadorizada BTFL. (A,B,C,D) cortes axiais em 2D (A), e tridimensionais sem escala de cor (B), com escala de cor “Bone” (C) e com escala de cor “Trabecular” (D). (E,F,G,H) cortes coronais em 2D (E), e tridimensionais sem escala de cor (F), com escala de cor “Bone” (G) e com escala de cor “Trabecular” (H). Setas vermelhas indicam paredes do alvéolo; Setas amarelas indicam áreas de tecido mais densas; Setas verdes indicam incisivo central do lado esquerdo; e, Setas pretas indicam possíveis áreas de biomaterial remanescente	41
Figura 6. Cortes histológicos grupo CO. (a,b,c,d) 7 dias, (A,B,C,D) 14 dias, (A',B',C',D') 28 dias	43
Figura 7. Cortes histológicos grupo BTF. (a,b,c,d) 7 dias, (A,B,C,D) 14 dias, (A',B',C',D') 28 dias	44
Figura 8. Cortes histológicos grupo LS. (a,b,c,d) 7 dias, (A,B,C,D) 14 dias, (A',B',C',D') 28 dias	45
Figura 9. Cortes histológicos grupo BTFL. (a,b,c,d) 7 dias, (A,B,C,D) 14 dias, (A',B',C',D') 28 dias	46
Figura 10. Cortes histológicos grupos CO (A) 7 dias, (B) 14 dias e (C) 28 dias; BTF (D) 7 dias, (E) 14 dias e (F) 28 dias; LS (G) 7 dias, (H) 14 dias e (I) 28 dias e BTFL (J) 7 dias, (K) 14 dias e (L) 28 dias.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise quantitativa microtomografia computadorizada. Descrição dos parâmetros utilizados e as médias dos valores obtidos nos diferentes grupos analisados	41
Tabela 2. Análise quantitativa histométrica. Descrição da quantidade de tecido ósseo e tecido conjuntivo presente nos diferentes grupos, nos três tempos analisados	48

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** (a) Análise estatística da fração de volume ósseo de cada grupo (BV/TV), (b) Análise estatística do número de trabéculas de cada grupo (Tb.N), (c) Análise estatística da espessura trabecular de cada grupo (Tb.Th), (d) Análise estatística da separação trabecular de cada grupo (Tb.Sp) 42
- Gráfico 2.** Análise estatística referente à quantificação da área de tecido ósseo presente nos grupos avaliados, nos três diferentes tempos de eutanásia 49
- Gráfico 3.** Análise estatística referente à quantificação da área de tecido conjuntivo presente nos grupos avaliados, nos três diferentes tempos de eutanásia 50

LISTA DE ABREVIATURAS

AO Área óssea

AT Conjuntivo Área total de tecido conjuntivo

AT Osso Área total de tecido ósseo

ATP Trifosfato de adenosina

BTF Grupo B-tricálcio-fosfato

BTFL Grupo B-tricálcio-fosfato associado com laserterapia

CO Grupo controle

HA Hidroxiapatita

LS Grupo laserterapia

MICRO-CT Microtomografia computadorizada

TOI Tecido ósseo imaturo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	PROPOSIÇÃO	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1	Animais e grupos experimentais	30
3.2	Cirurgia experimental	33
3.3	Análise dos cortes calcificados	33
3.3.1	Eutanásia	33
3.3.2	Análise Microtomográfica	34
3.4	Análise dos cortes descalcificados	34
3.4.1	Eutanásia	34
3.4.2	Análise histológica e histomorfométrica	35
3.5	Análise estatística	35
4	RESULTADOS	
4.1	Análise dos cortes calcificados	38
4.2	Análise dos cortes descalcificados	42
4.2.1	Análise histológica	42
4.2.2	Análise histométrica	47
4.2.3	Análise estatística	48
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXOS	63
	A	63
	B	64
	D	68

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Diversas formas de melhorar o processo de reparo nos tecidos vem sendo investigadas na atualidade, seja ele tecido mole ou duro. No passado, os materiais utilizados tinham apenas a finalidade de produzir um arcabouço com o objetivo de não provocar qualquer tipo de dano ao organismo, levando à perda do material. Visando uma melhora no tratamento e no prognóstico dos pacientes, foram desenvolvidos materiais que pudessem ir além de fornecer suporte, materiais que pudessem estimular o crescimento tecidual local os biomateriais.^{1,2}

Existe uma diversidade de biomateriais disponíveis no mercado, com propriedades e funções diferentes. Na odontologia os mesmos são muito utilizados na área de Implantodontia a fim de promover melhora no processo de osseointegração. Dentre as características dos biomateriais podemos citar a biocompatibilidade, capacidade do material de não induzir respostas adversas do organismo como alergias e processos inflamatórios severos e a bioatividade que garante a união do material ao tecido biológico. Além das características, é importante ressaltar a importância das diferentes finalidades dos biomateriais, que podem ser osteoindutores³ quando induzem a osteogênese através do recrutamento de células indiferenciadas estimulando sua diferenciação em células osteogênicas, osteocondutores³ no qual estimula o crescimento do tecido ósseo através do arcabouço instalado, promovendo diferenciação de células em toda região do enxerto e, por fim, a osteopromotores, que utiliza meios físicos, barreiras ou membranas, capazes de isolar o local, selecionando as células e permitindo sua proliferação.³⁻⁷

O padrão ouro para reparo de defeitos ósseos é o enxerto autógeno³, devido a sua capacidade de osteocondução e osteoindução, porém devido a imprevisibilidade da retenção de volume e a quantidade de reabsorção que pode haver na região,⁴⁻⁷ tem sido frequente a substituição deste pelos enxertos aloplásticos, os quais também possuem biocompatibilidade, capacidade de osteocondução e osteoindução,³ Além disso, os biomateriais possuem a vantagem de reduzir a morbidade dos procedimentos, não sendo necessária a realização de uma cirurgia para remoção de osso autógeno.⁸ Os biomateriais mais citados com

resultados promissores no reparo ósseo são a hidroxiapatita (HA) e o β - tricálcio-fosfato (β - TCP), associados ou não à laserterapia.^{8,9}

Estudos anteriores comparando HA com o β - TCP em defeitos ósseos mostraram que a HA estável promove a manutenção do volume na área enxertada enquanto ocorre substituição por osso no β - TCP solúvel.¹⁰ Os resultados também mostraram que as partículas de β -TCP eram mais biodegradáveis quando comparados com HA,¹⁰⁻¹² fato que pode ser explicado devido a dissolução química do material pelos tecidos e ação dos osteoclastos.^{10,13,14} Em outros estudos,¹⁵⁻¹⁷ foi avaliado a regeneração óssea desses materiais e os resultados mostraram um processo de remodelação óssea mais acelerado e com boa integração entre o material e o tecido ósseo.

A associação desses biomateriais com o LASER de baixa potência (terapêutico) tem acelerado o processo de reparo nos tecidos, apresentando efeitos antiinflamatório, analgésico e pode ter efeito estimulante sobre o sistema imune com participação ativa na regeneração celular.¹⁸ Os efeitos do LASER de baixa potência foi objetivo de diversos estudos, os quais comprovaram que promove bioestimulação, mesmo sem a associação com o biomaterial.¹⁹⁻²⁴

Os efeitos da fototerapia podem ser atribuídos à sua ação nas reações celulares, como o aumento na síntese de ATP e estimulação das células, além de afetar alguns processos bioquímicos e a condutividade da membrana celular, resultando no aumento da ação dos macrófagos, linfócitos e células envolvidas no reparo tecidual.⁹ O LASER também pode causar aumento na síntese de DNA e produção de colágeno, na deposição de cálcio²⁵ e aumento da neovascularização²⁶. A utilização das técnicas de aplicação de laserterapia tem mostrado resultados promissores quando utilizado sozinho e também em associação com biomateriais.^{8,9,27}

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos do LASER de baixa potência e do β -tricálcio- fosfato no processo de reparo alveolar após exodontia de incisivos superiores do lado direito em ratos Wistar por meio de análise tomográfica microcomputada (Micro-Ct), análise histológica e histométrica.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Grupos Experimentais

Para realização deste estudo foram utilizados 96 ratos (*Rattus norvegicus albinus* Wistar) machos, com 6 meses de idade, com peso corporal variando de 250 a 300 gramas, os quais foram submetidos à cirurgia de exodontia dos incisivos superiores direitos e, posteriormente, os alvéolos sofreram diferentes tipos de tratamentos. Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e a pesquisa foi encaminhada e aprovada pelo Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, processo nº 00298-2019 (Anexo A).

Os animais utilizados neste estudo foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA – UNESP. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas contendo 3 animais, ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante todo o experimento e água *ad libitum*, exceto no período de 12 horas antecedentes ao procedimento cirúrgico.

24 animais foram divididos em 4 (quatro) grupos experimentais com 6 animais cada para os cortes calcificados:

- Grupo CO - Controle- Após a exodontia do incisivo superior direito, o alvéolo foi preenchido apenas por coágulo sanguíneo e foi realizado a sutura com ponto simples

- Grupo BTF - Biomaterial (β -Tricálcio- Fosfato em pasta (Graftys HBS, Latin American Solutions - LAS Brazil))- Após a exodontia do incisivo superior direito, foi feito o preenchimento do alvéolo com pasta de β - Tricálcio- Fosfato e realizado a sutura com ponto simples

- Grupo LS - Laserterapia de Baixa Intensidade- Após a exodontia do incisivo superior direito, o alvéolo foi preenchido com coágulo, foi feito a sutura com ponto

simples e aplicação de LASER de diodo portátil de 100mW com um comprimento de onda de 660 ± 10 nm (HELBO® TheraLite Laser, Bredent Medical, Senden, Alemanha) equipado com uma sonda dedicada (HELBO® Pocket Probe 3D, Bredent Medical, Senden, Alemanha), que forneceu uma densidade de potência de 60 mW/cm² durante 60s em um único ponto, com o valor de 10,8J de energia total

- Grupo BTFL - Biomaterial (β -Tricálcio- Fosfato) + - Laserterapia - Após a exodontia do incisivo superior direito, o alvéolo foi preenchido com pasta de β - Tricálcio- Fosfato (Graftys HBS, Latin American Solutions - LAS Brazil), foi feito a sutura com ponto simples e aplicação de LASER de diodo portátil de 100mW com um comprimento de onda de 660 ± 10 nm (HELBO® TheraLite Laser, Bredent Medical, Senden, Alemanha) equipado com uma sonda dedicada (HELBO® Pocket Probe 3D, Bredent Medical, Senden, Alemanha), que forneceu uma densidade de potência de 60 mW/cm² durante 60s em um único ponto, com o valor de 10,8J de energia total.

Para análise dos cortes descalcificados, foram utilizados os mesmos grupos experimentais, com três tempos de eutanásia: 7,14 e 28 dias, totalizando 72 animais, como mostra o esquema a seguir (figura 1).

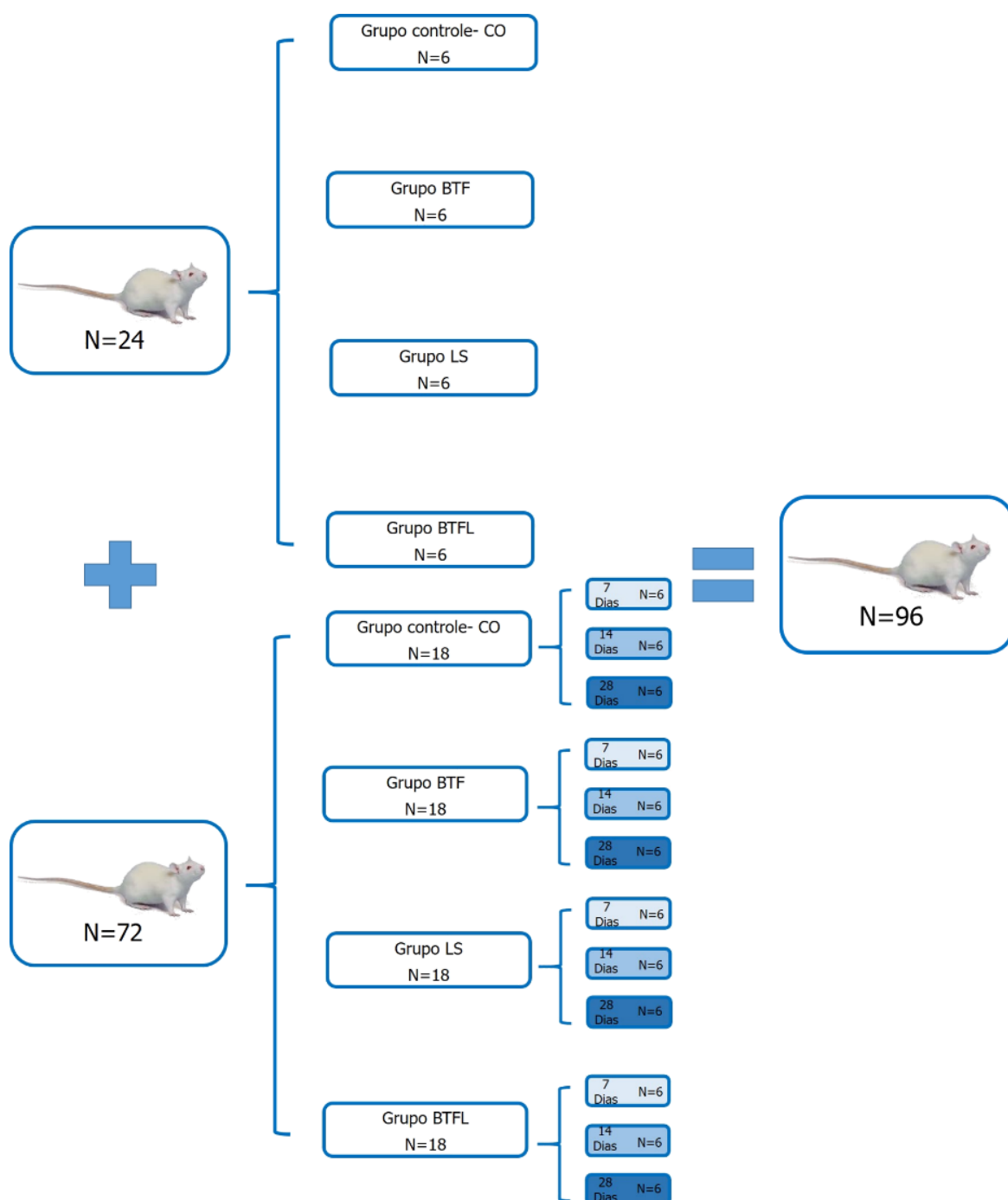


Figura 1. Fluxograma dos grupos experimentais

3.2 Cirurgia Experimental

O procedimento cirúrgico foi realizado sob sedação com injeção intramuscular (IM) de 90mg/kg de Cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil), e 10mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil)). Após sedação realizou-se a anti-sepsia com PVPI degermante e tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil), seguido da aposição de campos estéreis. Foi realizada a exodontia do incisivo central superior direito, utilizando instrumental especialmente adaptado para este fim²⁸. Como complementação anestésica os animais receberam infiltração local de cloridrato de 0.3 ml/Kg mepivacaína (Scandicaine 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal em mesa de operação personalizada. A sindesmotomia da inserção gengival foi realizada cuidadosamente por meio de um instrumental delicado (Hollembek, Quinelato, São Paulo, Brasil) seguido da luxação e exodontia do dente. Após a exodontia, cada grupo de animais recebeu um tratamento específico, citados anteriormente e a sutura foi realizada com fio absorvível de Poliglactina 910 espessura 4.0 (Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil)). No pós-operatório os animais receberam administração IM de 15 mg/kg de cefalotina (Keflin® Neutro, Antibióticos do Brasil Ltda, Sumaré, Brasil) a cada 12h por 48 horas e administração IM de 50mg/kg de dipirona (NOVALGINA®, solução injetável 500 mg/mL, Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda., São Paulo, Brasil) em dose única.

3.3 Análise dos Cortes Calcificados

3.3.1 Eutanásia

Passados 28 dias das exodontias, todos os 4 (quatro) grupos experimentais foram submetidos a eutanásia com dose excessiva de anestésico, tiopental sódico (150mg/kg) e lidocaína 2% (10 mg/kg). Foi realizada a ressecção em bloco da região alveolar dos incisivos superiores para análise microtomográfica.

3.3.2 Análise Microtomográfica (Micro-Ct)

Após a eutanásia dos animais, as maxilas dos animais dos 4 grupos experimentais foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 24 horas, seguidos de banho em água corrente por 24 horas. Após a fixação, as peças foram armazenadas em álcool 70%, para a realização da análise microtomográfica.

A análise microtomográfica foi realizada de acordo com metodologia descrita por Buxsein et al.²⁹ Por meio do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, S/N 13C09015, Bélgica, 2014) as peças foram escaneadas utilizando cortes de 6µm de espessura (80Kv e 125µA) com filtro de Al. 1mm e passo de rotação de 0.600 deg, tamanho do pixel de 20.600010 µm, 766 slices e tempo de aquisição de 1h e 20min. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas, determinando a área de terço médio pelo software NRecon (SkyScan Versão 1.6.10.4), com smoothing de 2, correção dos anéis de artefato de 20, correção de Beam Hardening de 0% e a faixa de conversão de imagem poderá variar de 0,0 – 0,03. No software Data Viewer (2014-11 SkyScan, 2012-17 Bruker Micro Ct, Versão 1.5.6.2 64-bit), as imagens foram reconstruídas para serem observadas em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (Special build Versão 1.13.10.1) foi avaliado e mensurado²⁹ o volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação e número de trabéculas (Tb.Sp e Tb.N), para então realizar a reconstrução em 3D e uso de filtros de cores pelo software CTvox (SkyScan, Versão 3.3.0 r1403 64-bit).

3.4 Análise dos Cortes Descalcificados

3.4.1 Eutanásia

Nesta metodologia de cortes descalcificados foram empregados 6 animais por período, totalizando 72 animais nos 3 períodos de análise. Nos tempos de 7, 14 e 28 dias após a exodontia dos incisivos centrais superiores do lado direito os animais foram submetidos a eutanásia com dose excessiva de anestésico, tiopental sódico

(150mg/kg) e lidocaína 2% (10 mg/kg). Foi realizado uma ressecção em bloco da região alveolar para análise histológica.

3.4.2 Análise Histológica e Histomorfométrica

As maxilas foram removidas e reduzidas para realização da análise histológica dos cortes em parafina. As amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP – Brasil) por 24 horas e após esta etapa foi iniciado o processo de descalcificação em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e hidróxido de sódio a 20%.

Após a descalcificação adequada, foi realizada a desidratação das peças através da sequência de álcoois sendo finalizada com o processo de diafanização com xilol. Na sequência as peças foram submetidas ao processo de embebição em parafina 1, 2, 3 e por fim foram imersas em parafina para inclusão. Em seguida, a parafina em excesso foi removida e as peças foram instaladas no sentido cervical (pósterio-anterior) nos tacos para realização de cortes sagitais de 5 µm de espessura por meio de micrótomo (RM2235, Leica Biosystems Nussloch GmbH 2017).

Cinco lâminas de cada amostra foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE). As imagens de lâminas coradas com HE foram obtidas através do microscópio óptico (Leica DM4000 B LED, Heerbruggm Switzerland) com o auxílio de lentes objetivas Carls Zeiss (6,3x 0,12, 12,5x 0,25 e 25x 0,50) acoplados uma câmera de captação de imagem e conectado ao computador (Configuração: Intel Core i5® com sistema operacional Windows 7® e Software para processamento e análise de imagens (AxioVision 4.9.1®0, Carl Zeiss by Imaging Associates ltd, Jena, Deutschland).

Foram determinadas áreas a serem avaliadas na análise quantitativa: área de tecido ósseo íntegro, tecido conjuntivo e biomaterial nos grupos BTF e BTFL.

3.5 Análise Estatística

Inicialmente foi aplicado um teste de normalidade para verificar a homogeneidade ou heterogeneidade da amostra. Os dados obtidos foram

submetidos à análise estatística (Shapiro- Wilk) e ao teste t de Tukey. Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise dos Cortes Calcificados

Análise Microtomográfica (Micro-Ct)

Foi realizada microtomografia das amostras dos 4 (quatro) grupos, obtendo-se cortes sagitais e axiais. Ambos os cortes evidenciaram as áreas de reparo, nos cortes sagitais (Figs 2,3,4 e 5- A,B,C,D), com vista completa do alvéolo no sentido apico-cervical e nos cortes axiais (Figs 2,3,4 e 5- E,F,G,H) no sentido latero-lateral. Observa-se a vista completa do alvéolo no sentido vestibulo-palatino e a vista do incisivo central do lado oposto (esquerdo) evidenciado pelas setas verdes.

No grupo CO, observou-se integridade das paredes do alvéolo (Fig 2. A, B- seta vermelha). Nas imagens tridimensionais observou-se áreas de tecido mais denso (Fig 2. C,D,G,H- setas amarelas), interpostas por áreas mais claras que sugerem presença de tecido conjuntivo, com discretas áreas de reparo ósseo (áreas azuis).

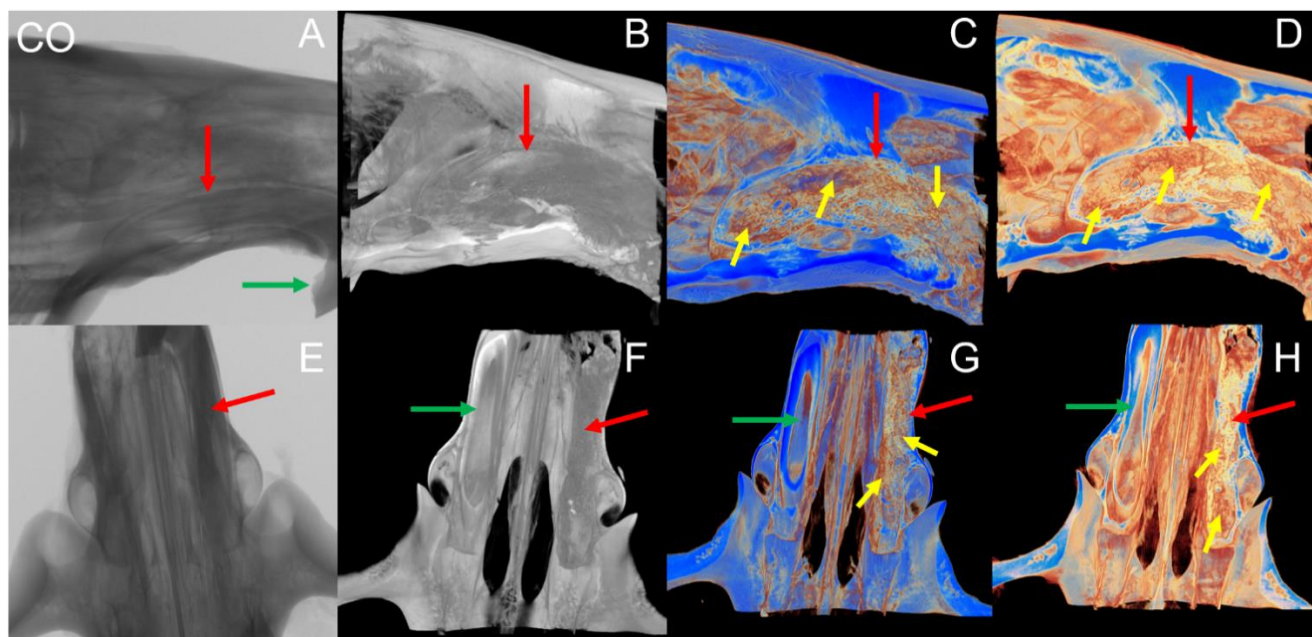


Figura 2. Microtomografia CO. (A) corte sagital bidimensional; (B) reconstrução sagital 3D, em escala preto e branco, mostrando paredes do alvéolo íntegras e ausência de remanescentes dentários; (C) reconstrução sagital 3D, em escala Blue, onde observa-se áreas mais escuras (setas amarelas), sugestivas de tecido ósseo imaturo, interposto por áreas mais claras, sugestivas de tecido conjuntivo; (D) reconstrução sagital 3D, em escala Trabecular; (E) corte coronal bidimensional, mostrando toda área da amostra que foi escaneada; (F) reconstrução axial 3D, escala preto e branco, onde observa-se integridade das paredes do alvéolo; (G) reconstrução axial 3D, escala Blue, em região de terço médio, mostrando preenchimento do alvéolo; (H) reconstrução axial 3D, escala Trabecular, em região de terço médio. Setas vermelhas mostram paredes do alvéolo íntegras; Setas amarelas evidenciam áreas com tecido mais denso, sugestivas de tecido ósseo imaturo; Setas verdes mostram incisivo central do lado esquerdo

Observou-se nas imagens bidimensionais do grupo BTF (Fig 3. A,E) integridade das paredes do alvéolo, bem como ausência de remanescentes dentários. Nas imagens tridimensionais, pode-se observar presença de remanescentes de biomaterial (Fig 3. B,F- setas pretas) e presença de áreas de tecido mais denso (Fig 3. C,D,G,H- setas amarelas) interpostas por áreas mais claras, sugestivas de tecido conjuntivo, além de áreas de reparo ósseo em cor azul (Fig 3. C,D,G,H).

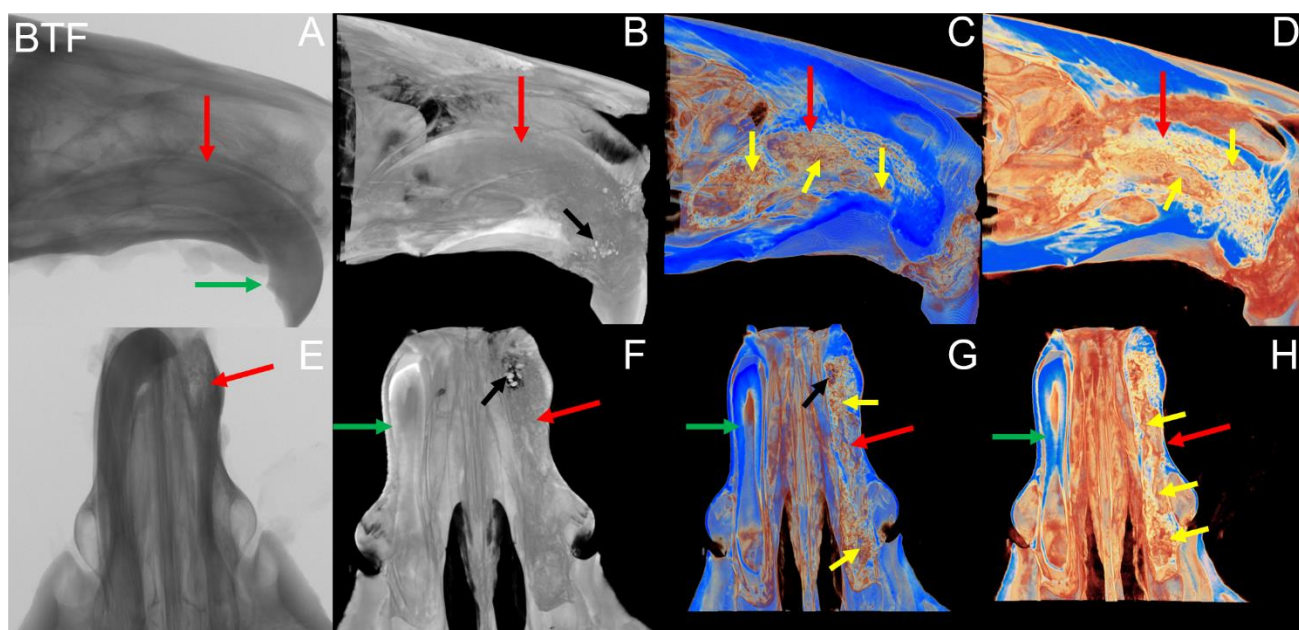


Figura 3. Microtomografia BTF. (A) corte sagital bidimensional; (B) reconstrução sagital 3D, em escala preto e branco, mostrando paredes do alvéolo íntegras e ausência de remanescentes dentários; (C) reconstrução sagital 3D, em escala Blue, onde observa-se áreas mais escuras (setas amarelas), sugestivas de tecido ósseo imaturo, interposto por áreas mais claras, sugestivas de tecido conjuntivo; (D) reconstrução sagital 3D, em escala Trabecular; (E) corte axial bidimensional, mostrando toda área da amostra que foi escaneada; (F) reconstrução axial 3D, escala preto e branco, onde observa-se integridade das paredes do alvéolo; (G) reconstrução axial 3D, escala Blue, em região de terço médio, mostrando preenchimento do alvéolo; (H) reconstrução axial 3D, escala Trabecular, em região de terço médio. Setas vermelhas mostram paredes do alvéolo íntegras; Setas pretas evidenciam remanescentes de biomaterial; Setas amarelas evidenciam áreas com tecido mais denso, sugestivas de tecido ósseo imaturo; Setas verdes mostram incisivo central do lado esquerdo

Em LS, observou-se grande quantidade de áreas com tecido mais denso (Fig 4. C,D,G,H- setas amarelas) e áreas de reparo ósseo, visível até nas imagens sem escala de cor (Fig 4. B,F), apresentando menor quantidade de tecido conjuntivo, quando comparado com os grupos CO e BTF.

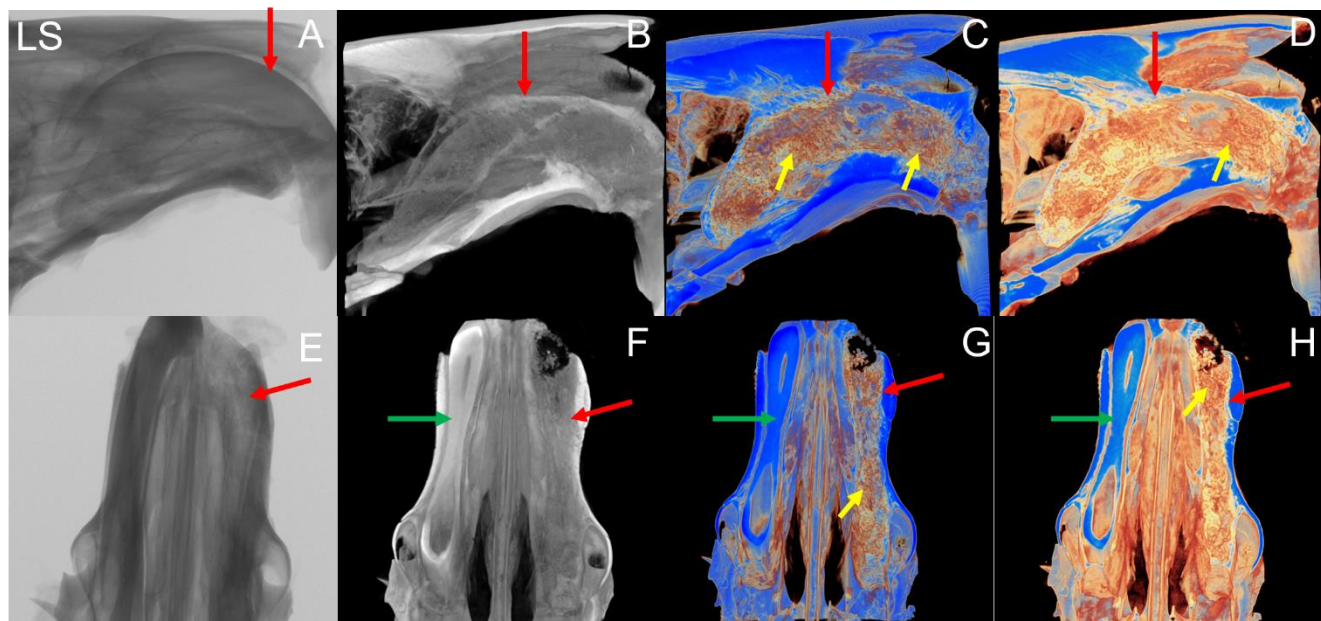


Figura 4. Microtomografia LS. (A) corte sagital bidimensional; (B) reconstrução sagital 3D, em escala preto e branco, mostrando paredes do alvéolo íntegras e ausência de remanescentes dentários; (C) reconstrução sagital 3D, em escala Blue, onde observa-se áreas mais escuras (setas amarelas), sugestivas de tecido ósseo imaturo, interposto por áreas mais claras, sugestivas de tecido conjuntivo; (D) reconstrução sagital 3D, em escala Trabecular; (E) corte axial bidimensional, mostrando toda área da amostra que foi escaneada; (F) reconstrução axial 3D, escala preto e branco, onde observa-se integridade das paredes do alvéolo; (G) reconstrução axial 3D, escala Blue, em região de terço médio, mostrando preenchimento do alvéolo; (H) reconstrução axial 3D, escala Trabecular, em região de terço médio. Setas vermelhas mostram paredes do alvéolo íntegras; Setas amarelas evidenciam áreas com tecido mais denso, sugestivas de tecido ósseo imaturo; Setas verdes mostram incisivo central do lado esquerdo

No grupo BTFL observou-se grande quantidade de áreas de tecido mais denso e de reparo ósseo (Fig 5. C,D,G,H- setas amarelas), com presença de remanescentes de biomaterial (Fig 5. C,G- setas pretas), mostrando que houve reabsorção de grande parte de biomaterial no período de 28 dias.

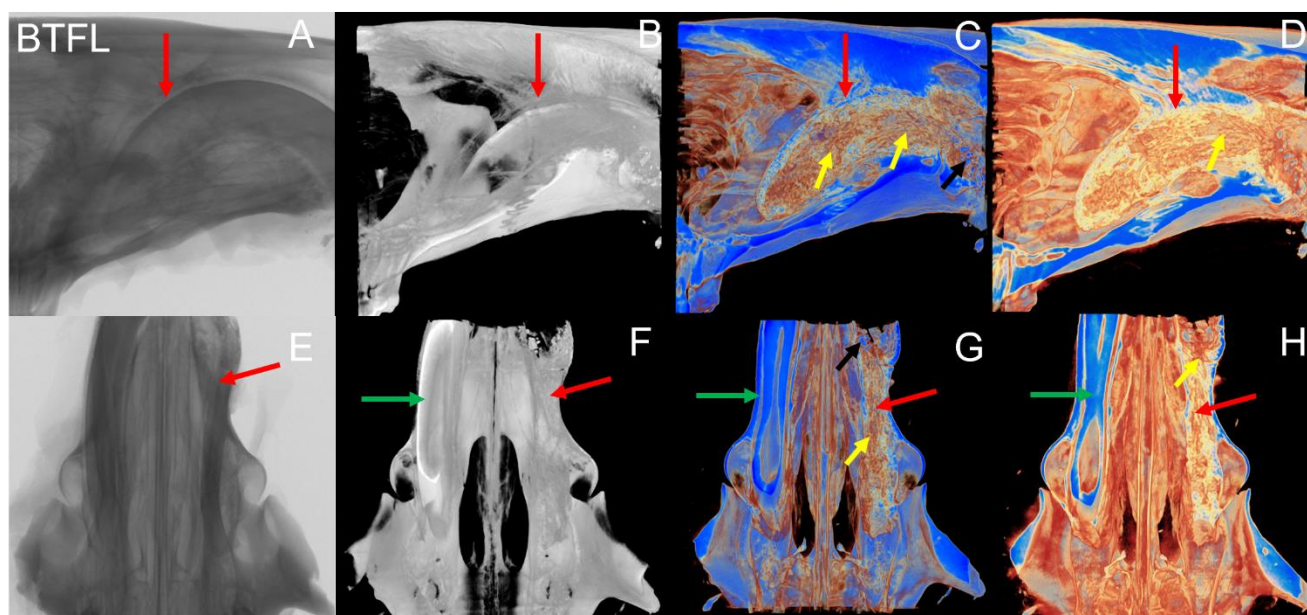


Figura 5. Microtomografia BTFL. (A) corte sagital bidimensional; (B) reconstrução sagital 3D, em escala preto e branco, mostrando paredes do alvéolo integras e ausência de remanescentes dentários; (C) reconstrução sagital 3D, em escala Blue, onde observa-se áreas mais escuras (setas amarelas), sugestivas de tecido ósseo imaturo, interposto por áreas mais claras, sugestivas de tecido conjuntivo; (D) reconstrução sagital 3D, em escala Trabecular; (E) corte axial bidimensional, mostrando toda área da amostra que foi escaneada; (F) reconstrução axial 3D, escala preto e branco, onde observa-se integridade das paredes do alvéolo; (G) reconstrução axial 3D, escala Blue, em região de terço médio, mostrando preenchimento do alvéolo; (H) reconstrução axial 3D, escala Trabecular, em região de terço médio. Setas vermelhas mostram paredes do alvéolo íntegras; Setas pretas evidenciam remanescentes de biomaterial; Setas amarelas evidenciam áreas com tecido mais denso, sugestivas de tecido ósseo imaturo; Setas verdes mostram incisivo central do lado esquerdo

Em relação à análise quantitativa, foram analisados 4 (quatro) parâmetros de quantidade e qualidade do tecido ósseo neoformado: BV/TV, Tb.N, Tb.Th e Tb.Sp. Os parâmetros e a média de cada grupo estão descritos na Tabela 1, onde observou-se que todos os grupos obtiveram valores semelhantes em cada parâmetro analisado.

TABELA 1

Análise quantitativa microtomografia computadorizada. Descrição dos parâmetros utilizados e as médias dos valores obtidos nos diferentes grupos analisados. BV/TV- fração de volume ósseo, Tb.N- número de trabéculas, Tb.Th- espessura trabecular e Tb.Sp- separação trabecular

Parâmetros	BV/TV (mm ²)	Tb.N (mm)	Tb.Th (mm)	Tb.Sp (mm)
CO	0,227893333	0,965443333	0,23445	0,96787
BTF	0,253163333	1,171617667	0,217046667	0,68304
LS	0,231463333	1,063786667	0,22049	0,81445
BTFL	0,221663333	1,033073333	0,21299	0,756726667

A análise estatística foi realizada separadamente para cada parâmetro e, como pode-se observar no Gráfico 1 (a,b,c,d), não houve diferença estatística entre os grupos em todos os parâmetros avaliados.

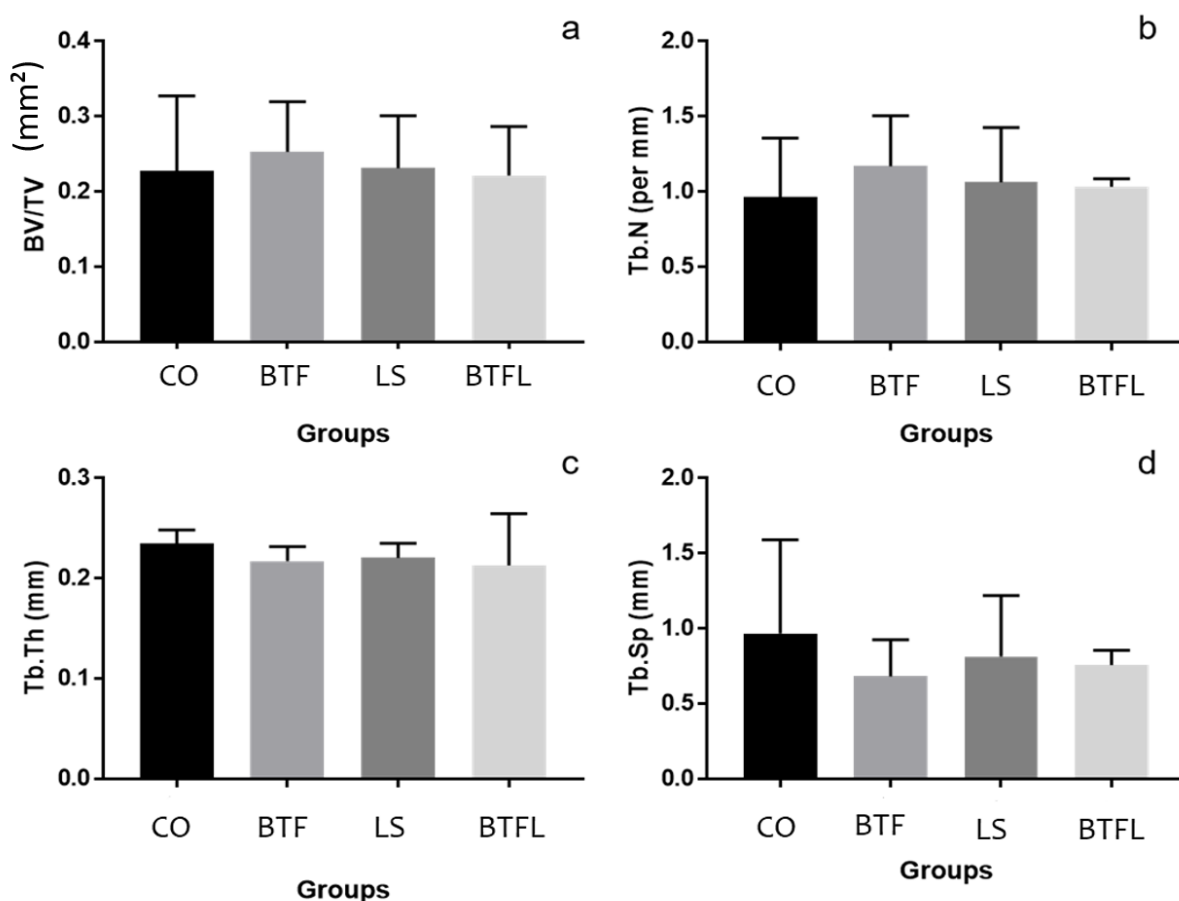


Gráfico 1. (a) Análise estatística da fração de volume ósseo neoformado, (b) Análise estatística do número de trabéculas formadas, (c) Análise estatística da espessura trabecular, (d) Análise estatística da separação trabecular.

4.2 Análise dos Cortes Descalcificados

4.2.1 Análise Histológica

Após o procedimento de corte dos blocos, foram confeccionadas lâminas histológicas com coloração HE, as quais foram fotografadas nos aumentos de 6,3x, 12,5x, 25x e 40x. Em seguida foi realizada a análise qualitativa e quantitativa de cada lâmina.

As imagens obtidas no grupo controle (CO) evidenciaram áreas de infiltrado inflamatório em região central do terço médio no período de 7 dias (Fig. 6.A,B,C,D), com presença grande quantidade de tecido conjuntivo (seta preta) e formação de vasos sanguíneos (seta branca) no interior do alvéolo. Entretanto, nas regiões mais próximas às paredes do alvéolo foram observadas áreas de tecido ósseo neoformado (seta azul claro).

No período de 14 dias (Fig. 6.a,b,c,d), observou-se presença de formação de tecido ósseo (seta azul claro) em grande parte do alvéolo, com presença de osteócitos nas lacunas (seta azul escuro), interposto por tecido conjuntivo e fibras colágenas (seta preta) e vasos sanguíneos (seta branca). Em 28 dias (Fig. 6.A',B',C',D') observou-se uma maior área de tecido ósseo neoformado (seta azul claro) em toda extensão do terço médio, interposto por áreas de tecido conjuntivo (seta preta).

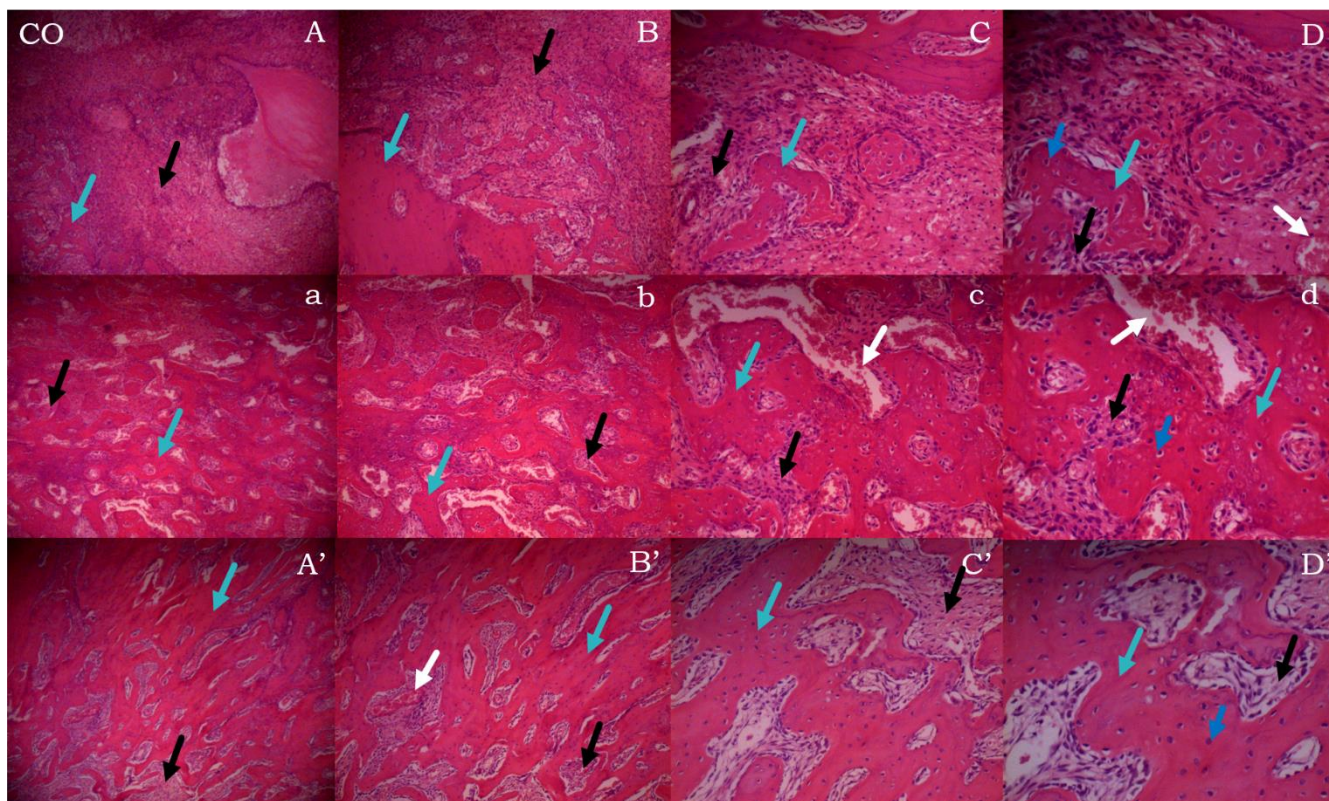


Figura 6. Histologia grupo CO em região de terço médio. Setas azuis claro indicam tecido ósseo, setas pretas indicam tecido conjuntivo, setas brancas indicam presença de vasos sanguíneos e setas azuis escuro indicam osteócitos. **7d:** (A) imagens histológicas em menor aumento, 6,3x0,12, (B) aumento de 12,5x0,25 em área central do terço médio, evidenciando áreas de neoformação óssea no interior do alvéolo, (C) aumento de 25x0,50 e (D) aumento de 40x. **14d:** (a) imagens histológicas em menor aumento, 6,3x0,12, (b) aumento de 12,5x0,25, (c) aumento de 25x0,50 e (d) aumento de 40x. **28d:** (A') imagens histológicas em menor aumento, 6,3x0,12, (B') aumento de 12,5x0,25, (C') aumento de 25x0,50 e (D') aumento de 40x

Nas imagens histológicas do grupo BTF, observou-se, no período de 7 dias (Fig. 7.A,B,C,D), em região central do terço médio, presença de pequena quantidade de partículas de biomaterial (seta verde), mostrando que houve reabsorção de grande parte do material, além de presença de grande quantidade de infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo (seta preta). A neoformação óssea no centro do alvéolo foi menor, quando comparada aos outros dois períodos, porém com presença de pequenas áreas de neoformação óssea, identificadas pela seta azul na imagem.

Em 14 dias (Fig.7. a,b,c,d) não foi observado presença de biomaterial no interior do alvéolo, apenas presença de uma maior área de neoformação óssea (seta azul claro) tanto em região periférica quanto em região central, com tecido conjuntivo interposto (seta preta) e formação de vasos sanguíneos (seta branca). No período de 28 dias (Fig.7.A',B',C',D'), observou-se neoformação óssea (seta azul claro) em grande quantidade em toda extensão do terço médio, com áreas menores de tecido conjuntivo (seta preta), principalmente em região central do terço médio.

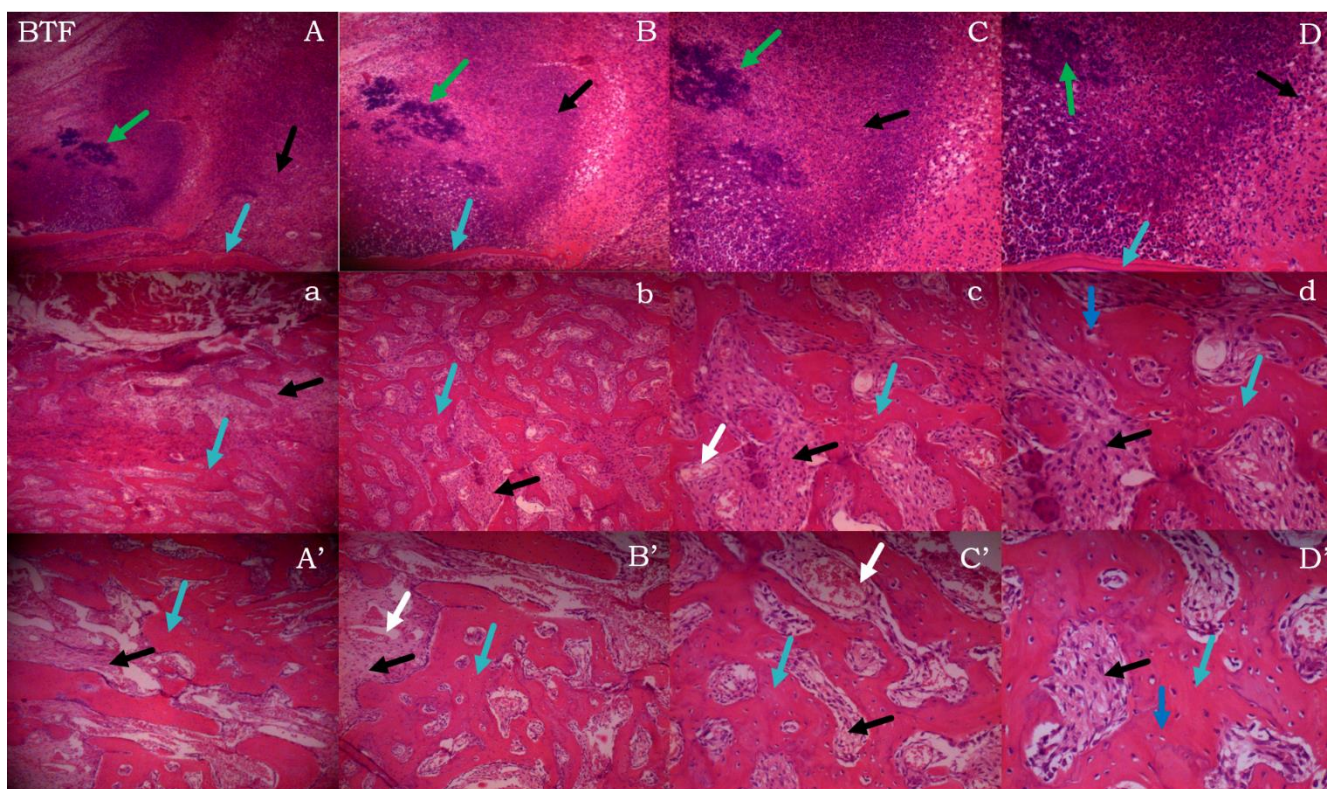


Figura 7. Histologia grupo BTF em região de terço médio. Setas azuis claro indicam áreas de tecido ósseo, setas pretas indicam área de tecido conjuntivo, setas brancas indicam presença de vasos sanguíneos, setas verdes indicam presença de biomaterial no interior do alvéolo e setas azuis escuro indicam osteócitos. **7d:** (A) imagens histológicas em menor aumento, 6,3x0,12, (B) aumento de 12,5x0,25, (C) aumento de 25x0,50 e (D) aumento de 40x. **14d:** (a) imagens histológicas em menor aumento, 6,3x0,12, (b) aumento de 12,5x0,25, (c)

aumento de 25x0,50 e (d) aumento de 40x. **28d:** (A') imagens histológicas em menor aumento, 6,3x0,12, (B') aumento de 12,5x0,25, (C') aumento de 25x0,50 e (D') aumento de 40x.

No grupo LS, observou-se neoformação óssea (seta azul claro) relativa já no período inicial- 7 dias (Fig. 8.A,B,C,D), com menor quantidade de tecido conjuntivo interposto (seta preta), quando comparado com o mesmo período dos outros grupos analisados. Nos períodos de 14 dias (Fig.8.a,b,c,d) e 28 dias (Fig.9. A',B',C',D'), observou-se evolução do processo de reparo, com presença de áreas de neoformação óssea em todo terço médio (seta azul claro). Indicando que o laser, além de acelerar as fases iniciais do processo de reparo, promoveu uma maior atividade osteogênica.

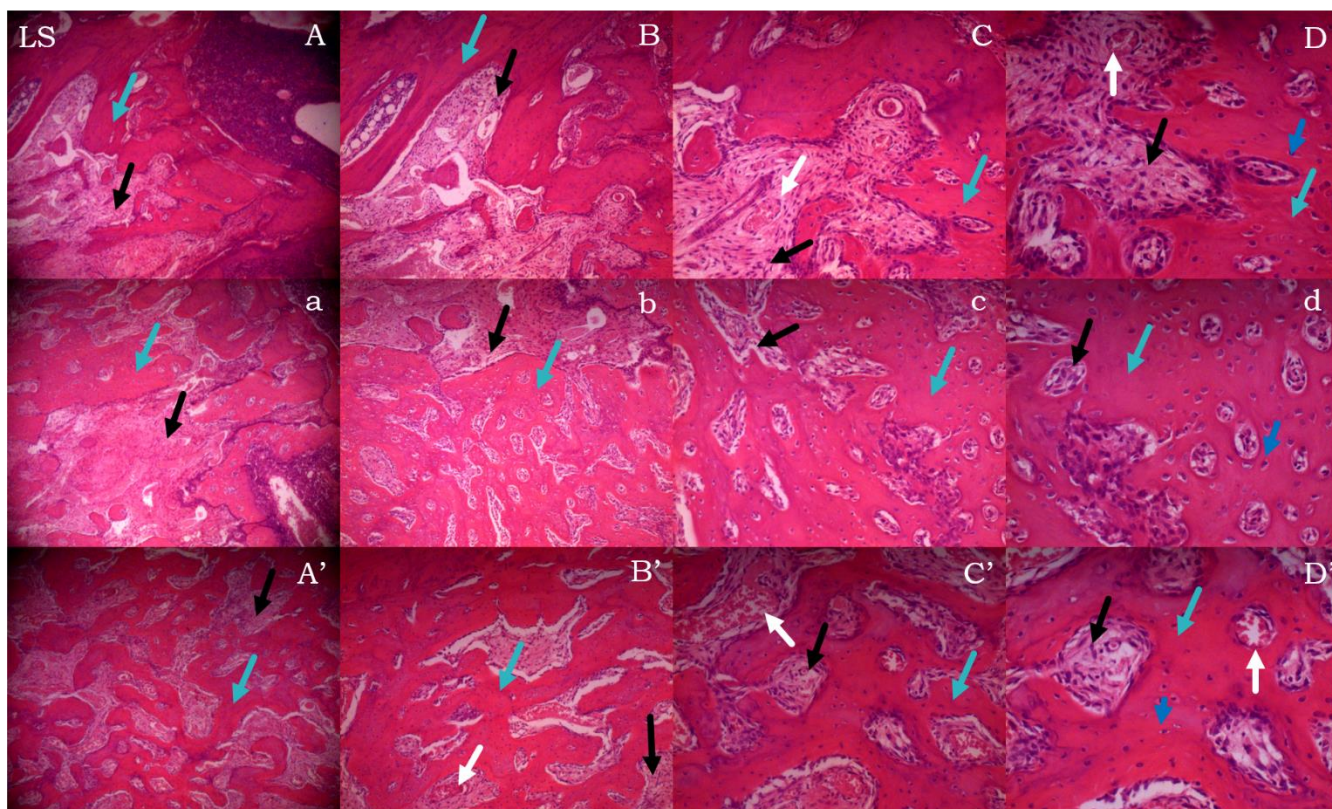


Figura 8. Histologia grupo LS em região de terço médio. Histologia grupo BTFL em região de terço médio. Setas azuis claro indicam áreas de tecido ósseo, setas pretas indicam área de tecido conjuntivo, setas brancas indicam presença de vasos sanguíneos, setas verdes indicam presença de biomaterial no interior do alvéolo e setas azuis escuro indicam osteócitos. **7d:** (A) imagens histológicas em menor aumento, 6,3x0,12, (B) aumento de 12,5x0,25, (C) aumento de 25x0,50 e (D) aumento de 40x. **14d:** (a) imagens histológicas em menor aumento, 6,3x0,12, (b) aumento de 12,5x0,25, (c) aumento de 25x0,50 e (d) aumento de 40x. **28d:** (A') imagens histológicas em menor aumento, 6,3x0,12, (B') aumento de 12,5x0,25, (C') aumento de 25x0,50 e (D') aumento de 40x.

As imagens do grupo BTFL, no período de 7 dias (Fig.9. A,B,C,D) evidenciam presença de biomaterial (seta verde), presença de tecido conjuntivo (seta preta) e algumas áreas de neoformação óssea em região central do terço médio (seta azul

claro). Em 14 dias (Fig.9.a,b,c,d) é possível visualizar presença de neoformação óssea (seta azul claro) em toda extensão do terço médio, com presença de tecido conjuntivo e fibras colágenas (seta preta).

No período de 28 dias (Fig.9. A',B',C',D') observou-se maior quantidade de áreas de tecido ósseo maduro (seta azul claro) e menor quantidade de tecido conjuntivo interposto (seta preta).

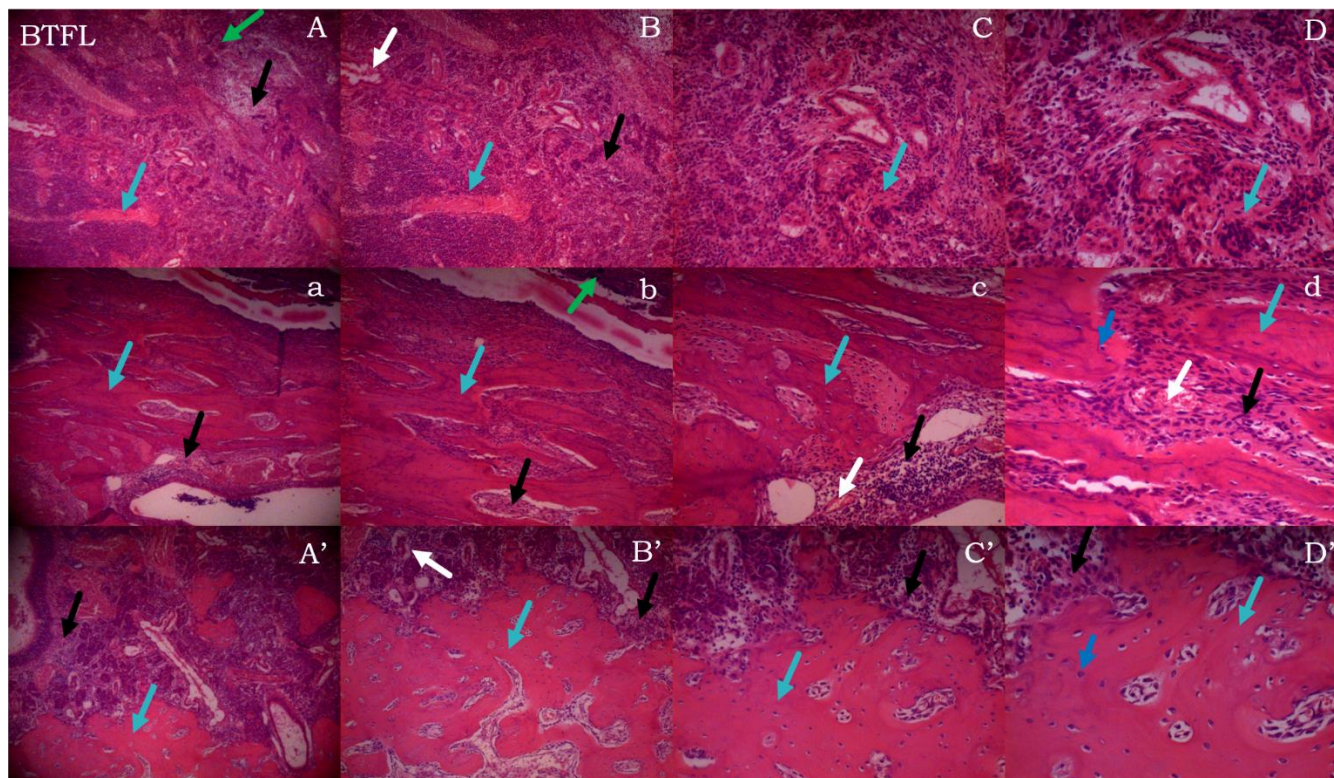


Figura 9. Histologia grupo BTFL em região de terço médio. Histologia grupo BTF em região de terço médio. Setas azuis claro indicam áreas de tecido ósseo, setas pretas indicam área de tecido conjuntivo, setas brancas indicam presença de vasos sanguíneos, setas verdes indicam presença de biomaterial no interior do alvéolo e setas azuis escuro indicam osteócitos. **7d:** (A) imagens histológicas em menor aumento, 6,3x0,12, (B) aumento de 12,5x0,25, (C) aumento de 25x0,50 e (D) aumento de 40x. **14d:** (a) imagens histológicas em menor aumento, 6,3x0,12, (b) aumento de 12,5x0,25, (c) aumento de 25x0,50 e (d) aumento de 40x. **28d:** (A') imagens histológicas em menor aumento, 6,3x0,12, (B') aumento de 12,5x0,25, (C') aumento de 25x0,50 e (D') aumento de 40x. **14d:** Grande quantidade de tecido ósseo neoformado em todos os aumentos.

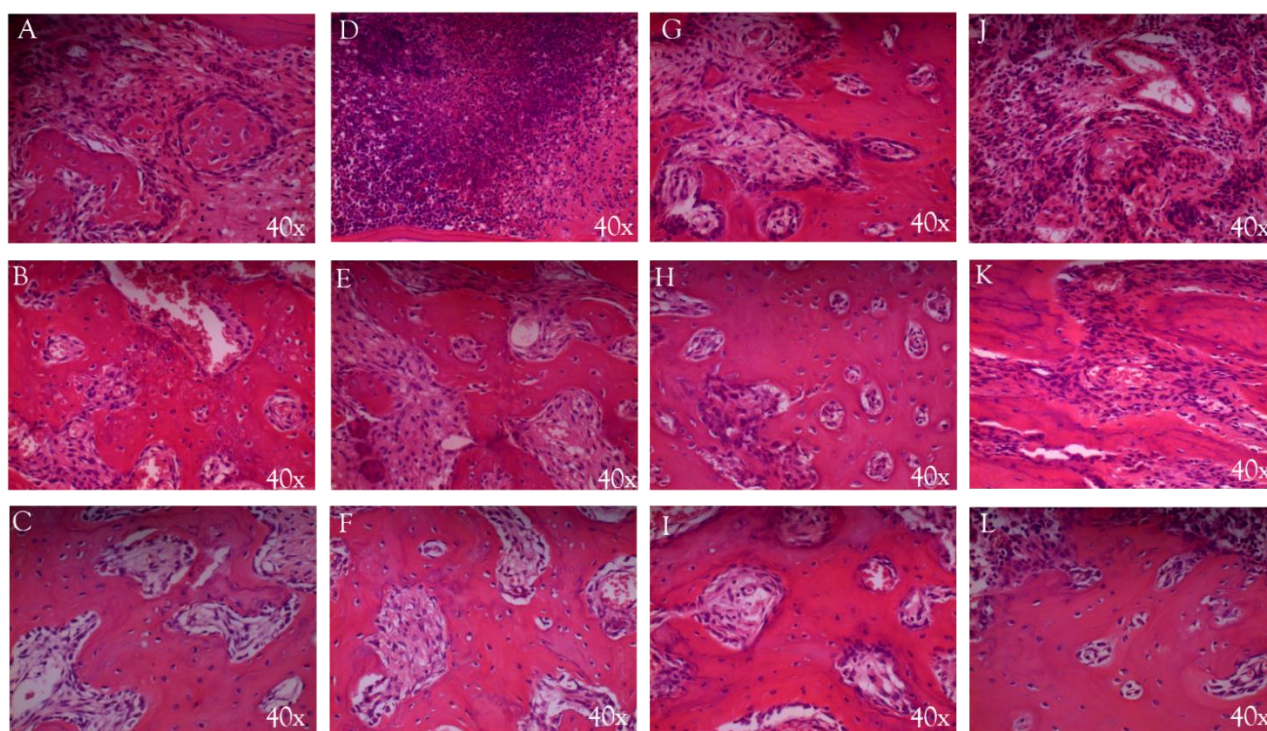


Figura 10. Cortes histológicos grupos CO (A) 7 dias, (B) 14 dias e (C) 28 dias; BTFL (D) 7 dias, (E) 14 dias e (F) 28 dias; LS (G) 7 dias, (H) 14 dias e (I) 28 dias e BTFL (J) 7 dias, (K) 14 dias e (L) 28 dias. Aumento de 40x.

4.2.2 Análise histométrica

Após a captura das fotografias das lâminas histológicas, as imagens capturadas com aumento de 12,5x0,25 foram separadas para análise histométrica. Para mensuração da área de tecido ósseo e área de tecido conjuntivo, foi utilizado o programa ImageJ 1.47v (Wayne Rasband, Nacional Institutes of Health, USA, Java 1.6.0_20, 32-Bit, 2258K of 1638MB- <1%), calibrado com régua de 500um.

Os dados obtidos estão presentes na Tabela 2, onde observa-se a média de cada período de cada grupo analisado.

TABELA 2

Média dos dados obtidos em análise histométrica. AO- área óssea, TOI- Tecido ósseo imaturo, área de biomaterial, AT Osso- Área total de tecido ósseo e AT Conjuntivo- Área total de tecido conjuntivo

Grupos/Variáveis	AO	TOI	Biomaterial	AT Osso	AT Conjuntivo
CO 7d	10,52%	13,34%	0,00%	23,86%	76,14%
CO 14d	30,59%	2,30%	0,00%	32,89%	67,11%
CO 28d	60,35%	0,00%	0,00%	60,35%	39,65%
BTF 7d	8,53%	11,58%	0,62%	20,73%	79,27%
BTF 14d	17,19%	7,73%	0,00%	24,92%	75,08%
BTF 28d	54,12%	0,00%	0,00%	54,12%	45,88%
LS 7d	21,52%	16,41%	0,00%	37,93%	62,07%
LS 14d	31,79%	7,67%	0,00%	39,46%	60,54%
LS 28d	58,61%	3,73%	0,00%	62,40%	37,60%
BTFL 7d	8,09%	13,01%	0,02%	21,12%	78,88%
BTFL 14d	27,28%	1,92%	0,00%	29,21%	70,79%
BTFL 28d	48,25%	0,00%	0,00%	48,25%	51,75%

De acordo com os dados obtidos na Tabela 2, verifica-se que a porcentagem de área total de tecido ósseo teve maior variação entre os períodos e não entre os grupos. Além disso, houve uma maior porcentagem de área total de tecido ósseo no período de 7 dias do grupo LS, mostrando que o LASER foi capaz de acelerar as fases iniciais do processo de reparo.

Embora o biomaterial estivesse presente em apenas 2 grupos, a porcentagem de resíduos foi muito baixa em ambos os grupos, em todos os períodos, mostrando que a reabsorção do biomaterial aconteceu de forma rápida.

4.2.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com os dados obtidos na análise histométrica, onde foram avaliadas 72 amostras distribuída em 12 grupos (4 grupos experimentais + 3 tempos por grupo). Os dados foram rodados no programa SigmaPlot 12.0 (Build 12.0.0.182, Copyright 2011 Systat Software, Inc.) e os resultados estão contidos nos Gráficos 1 e 2.

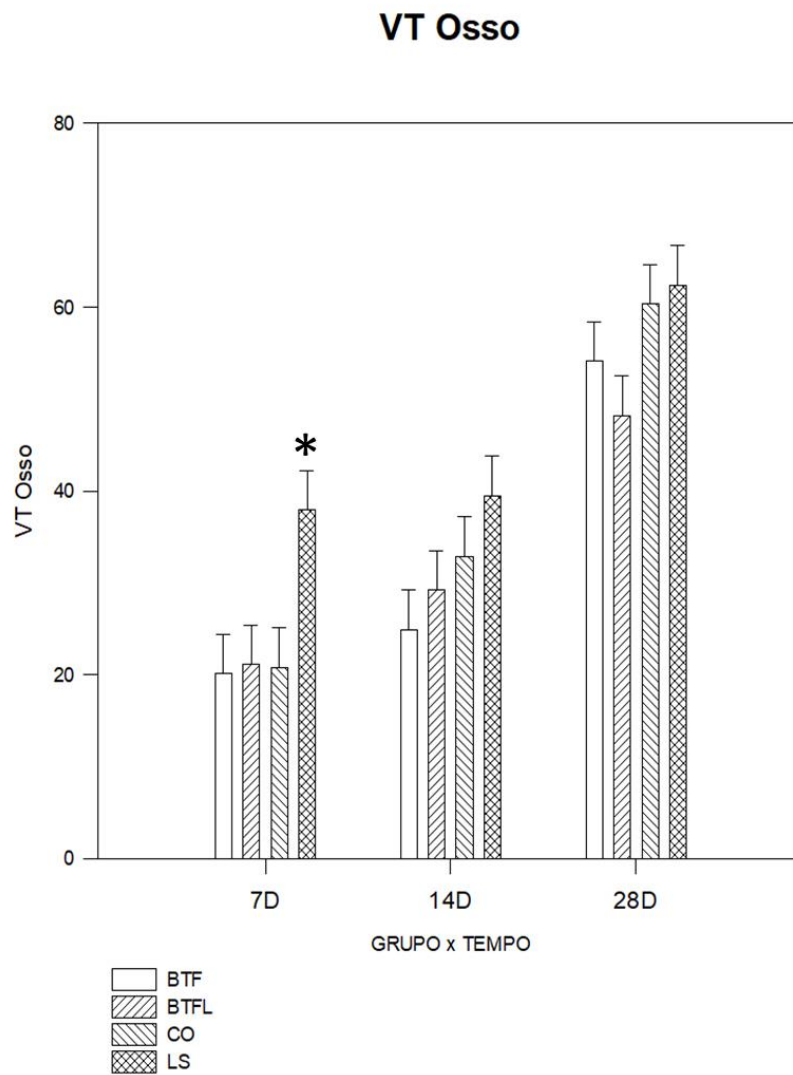


Gráfico 2. Análise estatística Área Total de Tecido Ósseo. A porcentagem está descrita no eixo x, os tempos no eixo y e os quatro grupos experimentais estão representados pelas barras. *diferença estatisticamente significativa.

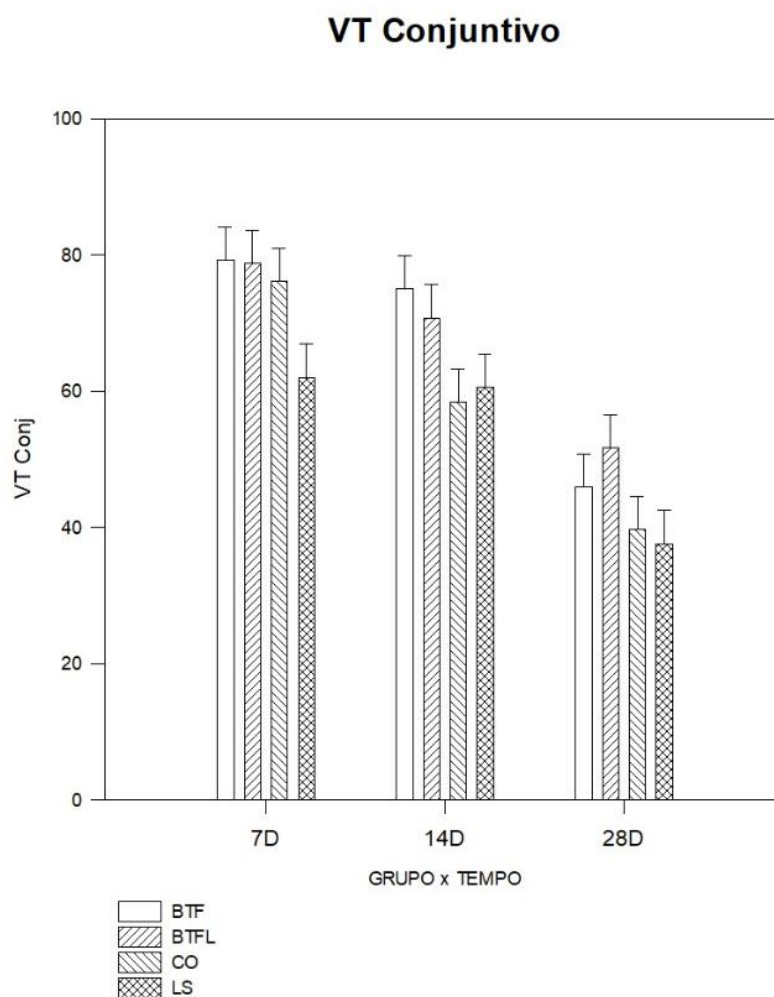


Gráfico 3. Análise estatística Área Total de Tecido Conjuntivo. A porcentagem está descrita no eixo x, os tempos no eixo y e os quatro grupos experimentais estão representados pelas barras.

Os resultados contidos nos Gráficos 1 e 2 mostraram que houve diferença estatística apenas entre o grupo LS no período de 7 dias e os outros grupos analisados.

Díscussão

5 DISCUSSÃO

A popularidade da implantodontia vem promovendo uma série de estudos sobre substitutos ósseos para pequenas ou grandes reabilitações. Tais estudos tem como objetivo comparar materiais a fim de obter maior número de substitutos ósseos com capacidade de estimular e induzir a formação de tecido ósseo em áreas com deficiências, diminuindo o custo e a morbidade do tratamento.

O presente estudo teve como objetivo comparar os efeitos do LASER na estimulação de neoformação óssea com as respostas promovidas pelo biomaterial e a associação de métodos. Os resultados foram promissores, mostrando que a laserterapia atuando sozinha acelerou o processo de neoformação óssea, no entanto apenas no primeiro período de análise de 7 dias e, quando associada ao biomaterial, promoveu uma redução da resposta inflamatória, como foi apresentado na figura 10. Observa-se que a resposta inflamatória no grupo BTF foi exacerbada no período de 7 dias e, ao associar à laserterapia, houve uma melhora do quadro inflamatório no mesmo período, mostrando que o LASER foi capaz de controlar a inflamação provocada pelo biomaterial.

Um estudo comparativo da velocidade de consolidação de fraturas, utilizando LASER terapêutico em ratos³⁰ mostrou que com apenas 4 sessões de aplicação houve atividade celular intensa e formação de calo ósseo, enquanto no grupo controle houve consolidação após o 24º dia do experimento. Foi visto também osteócitos em uma área correspondente ao canal de Havers, o que não foi visualizado no grupo controle. Os autores concluíram que o LASER promoveu um aumento na atividade de osteossíntese, devido à vascularização e ação antiinflamatória do mesmo. O mesmo foi observado no presente estudo, o qual avaliou períodos iniciais de reparo ósseo e, como observado na figura 8, o LASER acelerou a neoformação óssea mesmo em períodos iniciais (7 dias), com resultados estatisticamente superiores aos dos outros grupos avaliados.

Outro estudo previamente publicado³¹ utilizou LASER de AsGaAl ($\lambda=830\text{nm}$ e potência de 20mW) e o LASER de He-Ne ($\lambda=632,8\text{nm}$ e potência de 6mW) para avaliar a regeneração óssea em alvéolos pós-exodontia mostrou radiograficamente e macroscopicamente um maior volume ósseo no grupo que foi irradiado, mostrando

que houve uma ativação na regeneração do tecido ósseo. Também foi estudado os efeitos sobre os osteócitos e reabsorção em áreas enxertadas. Foi utilizado LASER com potência de 100mW e comprimento de onda de 690nm durante 1 minuto (6J) imediatamente após a perfuração e inserção dos enxertos em babuínos. Os resultados mostraram que a viabilidade dos osteócitos foi consideravelmente maior no grupo irradiado quando comparado com o grupo não irradiado, comprovando que houve uma aceleração no processo de formação óssea, contudo, o LASER não afetou a reabsorção³². O presente estudo seguiu este mesmo protocolo de laserterapia, em ratos, e obteve resultados semelhantes (figuras 4 e 8), evidenciando a eficácia do método para acelerar o processo de reparo ósseo.

Pinheiro et al.²⁷, associou LASER de baixa potência com enxerto de osso bovino, com aplicações a cada 48h por 15 dias. Os resultados mostraram que houve um reparo avançado nos grupos irradiados quando comparado aos grupos que não foram irradiados, além da presença de neoformação óssea e presença de concentração de fibras colágenas ao redor do enxerto no 15º dia após a cirurgia. Sendo assim, houve melhores resultados nos grupos enxertados com laserterapia presente. Outros estudos^{8,9} associaram biomaterial sintético (HA+ β -TCP) e LASER de baixa potência e concluiu que a associação favoreceu o processo de reparo, acelerando o mesmo, obtendo-se melhores resultados.

Estudo previamente publicado¹⁵ avaliou a capacidade de regeneração óssea do β -TCP biomimético, mostrou que a degradação e reabsorção do mesmo pelos osteoclastos estimula a liberação de íons cálcio e fosfato, podendo acelerar o processo de remodelação óssea. Além disso, o osso recém formado era mais espesso e organizado, podendo ser visto osso infiltrando o material, mostrando que houve uma boa integração entre material e tecido.¹⁵⁻¹⁷ Neste estudo, foi avaliado os efeitos da pasta de β -TCP no reparo ósseo em alvéolo de ratos e observou-se que mesmo em períodos iniciais (7 dias), havia poucos ou mesmo nenhum resíduo/partícula de biomaterial presente no interior do alvéolo, sugerindo a rápida reabsorção do mesmo. Entretanto, esse fato não prejudicou o processo de reparo, permitindo formação de tecido ósseo no interior do alvéolo em fases iniciais (Figura 7). Foi observado uma quantidade mínima de tecido ósseo no período de 7 dias, e uma grande evolução do processo em 14 dias, onde observou-se uma grande

quantidade de tecido ósseo neoformado em toda extensão do terço médio do alvéolo.

Outro estudo previamente publicado³³, utilizou o β -tricálcio-fosfato associado com HA em alvéolos de ratos e concluiu que o material é biocompatível, promove boa integração óssea, é gradualmente reabsorvível e pode ser considerado um substituto ósseo viável. No presente estudo, foi avaliado os efeitos do β -tricálcio-fosfato de forma isolada (figuras 3 e 7) e os resultados também foram promissores. Embora tenha degradado rapidamente, o biomaterial obteve respostas semelhantes aos outros grupos avaliados, permitindo neoformação óssea em toda área do terço médio.

Em outro estudo previamente publicado³⁴, no qual foi comparado os efeitos do LASER, LED, biomaterial (β -tricálcio-fosfato + HA), biomaterial + laserterapia e biomaterial + LED, o grupo biomaterial+ LASER mostrou melhores resultados, concluindo que o uso do LASER melhorou o reparo de defeitos ósseos preenchidos com biomaterial. Fato observado nas figuras 5 e 9 deste presente estudo. Tanto nas imagens microtomográficas quanto nas imagens histológicas e análise quantitativa das mesmas, foi observado que o LASER acelerou o processo de reparo e permitiu uma maior neoformação óssea. Quando associado com biomaterial (β -TCP) não apresentou os resultados previstos, mostrando que o biomaterial e o LASER possuem maior eficácia quando atuam de forma isolada.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Tanto o LASER quanto o biomaterial mostraram melhores resultados quando empregados de forma isolada;
- O LASER de baixa potência acelerou as fases iniciais do processo de reparo alveolar, além de controlar o processo inflamatório provocado pelo biomaterial no grupo BTFL.

Referências

REFERÊNCIAS

- 1- Von Recum Af, LaBerge M. Educational goals for biomaterials science and engineering: prospective view. *J Appl Biomater.* 1995;6:137-144.
- 2- Ferreira P, Coelho JF, Gil MH. Development of a new photocrosslinkable biodegradable bioadhesive. *Int J Pharm.* 2008;352:172-181.
- 3- Anavi Y, Avishai G, Calderon S, Allon DM. Bone remodeling in onlay beta-tricalcium phosphate and coral grafts to rat calvaria: microcomputerized tomography analysis. *J Oral Implantol.* 2011;37:379-386.
- 4- Zins JE, Whitaker LA. Membranous versus enchondral bone implications for craniofacial reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 1983;72:778–785.
- 5- Phillips JH, Bahn BA. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone graft revascularization and bone deposition. *Plast Reconstr Surg.* 1990;85:891–897.
- 6- Ozaki W, Buchman SR, Goldstein SA, Fyhrie DP. A comparative analysis of the microarchitecture of cortical membranous and cortical endochondral onlay bone grafts in the craniofacial skeleton. *Plast Reconstr Surg.* 1999;104:139–147.
- 7- Buchman SR, Ozaki W. The ultrastructure and resorptive pattern of cancellous onlay grafts in the craniofacial skeleton. *Ann Plast Surg.* 1999;43:49–56.
- 8- Pinheiro ALB, Soares LGP, Marques AMC, Cangussú MCT, Pacheco MTT, Silveira L Jr. Biochemical changes on the repair of surgical bone defects grafted with biphasic synthetic micro-granular HA + β -tricalcium phosphate induced by laser and LED phototherapies and assessed by Raman spectroscopy. *Lasers Med Sci.* 2017;32:663–672.
- 9- Soares LGP, Marques AMC, Aciole JMS, Guarda MG, Cangussú MCT, Silveira L Jr, Pinheiro ALB. Do laser/LED phototherapies influence the outcome of the repair of surgical bone defects grafted with biphasic synthetic microgranular HA + β -tricalcium phosphate? A Raman spectroscopy study. *Lasers Med Sci.* 2014; 29:1575–1584.
- 10- Sanda M, Shiota M, Fujii M, Kon K, Fujimori T, Kasugai S. Capability of new bone formation with a mixture of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate granules. *Clin Oral Impl Res.* 2015;26:1369–1374.

- 11-Koerten HK, van der Meulen J. Degradation of calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res.* 1999;44:78 –86.
- 12-Lu J, Descamps M, Dejou J, Koubi G, Hardouin P, Lemaitre J, Proust JP. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. *J Biomed Mater Res.* 2002;63:408–412.
- 13-Lu JX, Gallur A, Flautre B, Anselme K, Descamps M, Thierry B, Hardouin P. Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits. *J Biomed Mater Res.* 1998;42:357–367.
- 14-Zerbo IR, Bronckers AL, de Lange G, Burger EH. Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials.* 2005;26:1445–1451.
- 15-Chou J, Hao J, Kuroda S, Ben-Nissan B, Milthopre B, Otsuka M. Bone regeneration of calvarial defect using marine calcareous-derived beta-tricalcium phosphate macrospheres. *J Tissue Eng.* 2014;5:2041731414523441.
- 16-Garrido CA, Lobo SE, Turíbio FM, Legeros RZ. Biphasic calcium phosphate bioceramics for orthopaedic reconstructions: clinical outcomes. *Int J Biomater.* 2011;2011:129727.
- 17-LeGeros R. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;395:81–98.
- 18-Gutknecht N, Franzen R, Schippers M, Lampert F. Bactericidal effect of a 980-nm diode laser in the root canal wall dentin of bovine teeth. *J Clin Laser Med Surg.* 2004;22:9-13.
- 19-Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg.* 1971;122:532-535.
- 20-Khadra M, Rønold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haanaes HR. Low-level laser therapy stimulates bone-implant intereaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Impl Res.* 2004;15:325-332.
- 21-Hode L, Tuner J. Wrong parameters can give just any results. *Lasers Surg Med* 2006;8:343.
- 22-Genovese WJ. Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia. São Paulo: Ed. Santos; 2007.

- 23-Kim YD, Kim SS, Hwang DS, Kim SG, Kwon YH, Shin SH, Kim UK, Kim JR, Chung IK. Effect of low-level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. *Lasers Surg Med.* 2007;39:441-450.
- 24-Torres MRO, Teixeira E. Influência do laser de baixa potência (GaAlAs – $\lambda 830\text{nm}$) na formação óssea em relação à estabilidade primária em osso tipo IV. *Rev Odonto Ciênc.* 2008;23:175-181.
- 25-Yamada K. Biological effects of low power laser irradiation on clonal osteoblastic cells (MC3T3-E1). *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi.* 1991;65:787-799.
- 26-Tang XM, Chai BP. Effect of CO2 laser irradiation on experimental fracture healing: a transmission electron microscopic study. *Lasers Surg Med.* 1986;6:346–352.
- 27-Pinheiro AL, Limeira Júnior FA, Gerbi ME, Ramalho LM, Marzola C, Ponzi EA. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. *Braz Dent J.* 2003;14:177-181.
- 28- Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Aracatuba.* 1973;2:153-169.
- 29-Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010;25:1468-1486.
- 30-Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidates faster with low power laser. *Lasers Surg. Med.* 1987;7:36-45.
- 31-Nagasawa A, Negishi K. Clinical applications of LLLT in dental and oral surgery in the urawa clinic. In: Turnér J, Hode L. *Low level laser therapy: clinical practice and scientific background.* Estocolmo: Prisma Books; 1999: 59-60.
- 32-Dörtbudack O, Haas R, Mailath-Pokorny G. Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13:288-292.
- 33-Macedo RM, Lacerda AS, Thomazini JÁ, Brentegani LG. Bone integration behavior of Hidroxiapatite/B-tricalcium phosphate graft implanted in dental alveoli: a histomorphometric and scanning eletron microscopy study. *Implant Dent.* 2014;23:710-715.

- 34- Pinheiro ALB, Soares LGP, Marques AMC, Cangussú MCT, Pacheco MTT, Silveira L Jr. Biochemical changes on the repair of surgical bone defects grafted with biphasic synthetic micro-granular HA+B-tricalcium phosphate induced by laser and LED phototherapies and assessed by Raman spectroscopy. *Lasers Med Sci.* 2017;32:663-672.

Anexos

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA)

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  **Aracatuba**

CAMPUS ARAÇATUBA
 FACULDADE DE ODONTOLOGIA
 FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
 CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação do processo de reparo alveolar em ratos utilizando B-Tricálcio-Fosfato associado ou não ao laser de baixa potência", Processo FOA nº 00298-2019, sob responsabilidade de Francisley Ávila Souza apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 10 de Maio de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 13 de Dezembro de 2019.

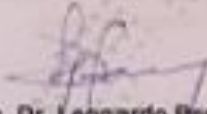
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 13 de Janeiro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Evaluation of the alveolar repairs process in rats using B-Tricálcio-Phosphate associated or not to low power laser", Protocol FOA nº 00298-2019, under the supervision of Francisley Ávila Souza presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 10, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 13, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 13, 2020.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
 Coordenador da CEUA
 CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
 Faculdade de Odontologia de Aracatuba
 Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba
 Rua José Bonfácio, 1193 - Via Nereu de Azevedo - CEP: 16015-082 - ARAÇATUBA - SP
 Fone (16) 3634-3234 E-mail CEUA: ceua@fva.unesp.br

ANEXO B – Normas da revista selecionada para a publicação do(s) artigo(s).

Journal of Oral Implantology

Manuscript Files to Include in Submission

Cover Letter

The cover letter should contain the following information in the form of a letter addressed to the Editor-in-Chief:

- Why the paper is being submitted
- What each of the authors contributed to the paper
- The complete contact information for the corresponding author

Title Page

JOI conducts double-blind reviews of all submitted articles. Each submission should include a document, separate from the manuscript, that contains the following information:

- Full article title
- Short title
- All author names (in the exact same order as the names are entered into the submission form in the peer review system)
- Earned degrees (PhD, DDS, etc) for all authors
- All authors' affiliations
- Complete contact information for the corresponding author (address, telephone/fax numbers, e-mail address)
- Acknowledgments
- Conflict of interest statement

Please note that the qualifications and professional titles of the authors will not be included in the published paper. The name of the institution where the research was performed also will not be included in the published paper.

Manuscript

Assemble the manuscript in the following order, with each item beginning a new page. Please turn on line numbering in the Word file.

- Abstract & Key Words (not applicable for Case Letters and Research Letters) o 250 words or fewer o Do not use subheadings or abbreviations o Should be one continuous paragraph o Must contain all relevant information, including results and conclusion o Should contain 6 or fewer key words
- Body Text. Please ensure that the body text of your paper conforms to the following structure: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and Conclusion.

Introduction

- ♣ Present the type and extent of the problem studied.
- ♣ Review briefly the relevant literature.
- ♣ State the rationale for the study.
- ♣ Explain the purpose in writing the paper.
- ♣ State the method of investigation and the reasons for the choice of a particular method.
- ♣ Write in the present tense.

Materials and Methods

- ♣ Give the full details but limit references.
- ♣ Write in the past tense.
- ♣ Include exact technical specifications, quantities, and generic names.

- ♣ Limit the number of subheadings, and use the same subheadings in the results section.
- ♣ State the statistical analysis used.
- ♣ Indicate that the methodology was reviewed by an independent statistician (for Clinical Research and Dental Implant Science Research papers only).
- ♣ Do not mention the investigators' qualifications or the institution where the work was performed.

Results

- ♣ Do not describe methods.
- ♣ Present results in the past tense.
- ♣ Present representative data rather than endlessly repetitive data.
- ♣ Use tables where appropriate, and do not repeat information that can be found in the text.

Discussion

- ♣ Discuss—do not reiterate—the data found in the results section.
- ♣ Point out exceptions and lack of correlations in the data. Do not try to disguise or “spin” data.
- ♣ Show how results concur and/or contrast with previous work.
- ♣ Discuss the implications of the study's findings.

Conclusion

- ♣ State your conclusions clearly.
- ♣ Conclusion must be supported by and limited to the results of the study.

Abbreviations

- ♣ Include a list of all abbreviations used in the paper with definitions for each abbreviation.

References

Do not use endnotes; instead, type in all references as text. References strictly follow AMA Manual of Style, 10th edition. In-text citations to references should be indicated using superscripted numbers in numerical order. The references should then be listed at the end of the article in the order they are mentioned in the text. Unpublished observations, personal communications, submitted papers not yet accepted, and abstracts may not appear in the reference section. Refer to written, not oral, communications parenthetically in the text. Also refer to web sites parenthetically in the text. Include among the references papers accepted but not yet published, and label them as “in press.” Sample references are below:

- Article from a journal

Davarpanah M, Martinez H, Tecucianu JF, Hage G, Lazzara R. The modified osteotome technique. *Int J Periodontics Restor Dent*. 2001;21:599–607.

- Chapter from a book

Jensen OT. Guided bone graft augmentation. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK, eds. *Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry*. 1st ed. Chicago, Ill: Quintessence Publishing Co Ltd; 1994: 234–264. o Book Misch CE. *Contemporary Implant Dentistry*. St Louis, Mo: Mosby Year Book; 1993.

- Paper

Ho E, Marcolongo M. The effect of coupling agents on hydroxyapatite/polymethylmetacrylate composite. Paper presented at: Drexel University Research Day, April 22, 2003; Philadelphia, Pa.

- Web

Freiberg RJ, Boutossov D, Cozean C. Role of water irrigation during laser ablation of hard dental tissue. Available at: http://www.laserdentistry.org/praf/edu_overview.cfm. Accessed February 15, 2004.

Tables

Tables should be numbered consecutively and titled. Use the table function within Microsoft Word to create tables. Table columns should have explanatory headings. Each table should appear on a separate page in the manuscript file following the references. Tables must provide information that cannot be adequately dealt with in the text and should not duplicate (or be a rewording of) information presented in the text. Tables will be formatted and paged in JOI style by the Publisher.

Captions to figures.

Please supply complete captions for all figures on a separate page at the end of the manuscript. Authors should not use symbols in figure captions; instead, a key should be included as part of the figure. Submit each part of a multi-part figure in separate files. Use letters in the caption for the corresponding figure.

Figures For electronic figures, the Publisher will accept .eps, .tif, .pdf, and .jpg formats. Images must be at least 4.0 in. (10.2 cm) in width with a resolution of at least 200 dpi. Figure quality may be checked using the complimentary Allen Press VeriFig service available at <http://verifig.allenpress.com/login>. Do not embed figures within the Microsoft Word document containing the manuscript. It is the author's responsibility to obtain written permission to use figures that have appeared in another publication. Proof of permission to use previously published figures must be presented at the time of submission, and credit to the original source must be given in the figure caption.

Rebuttal Letter/Response to Reviewers (for Revised Submissions Only)

When submitting a revised paper that previously received a Major Revision or Minor Revision decision, please include a letter that provides a response for each point raised by the reviewers. The letter should also describe all the changes made to the paper. Reprints Authors will receive a complimentary PDF reprint of their article 3–4 weeks after publication. Paper reprints are available for purchase at the time of publication. The corresponding author will be sent an informational email when it is time to place orders for paper reprints.

Review of Your Paper

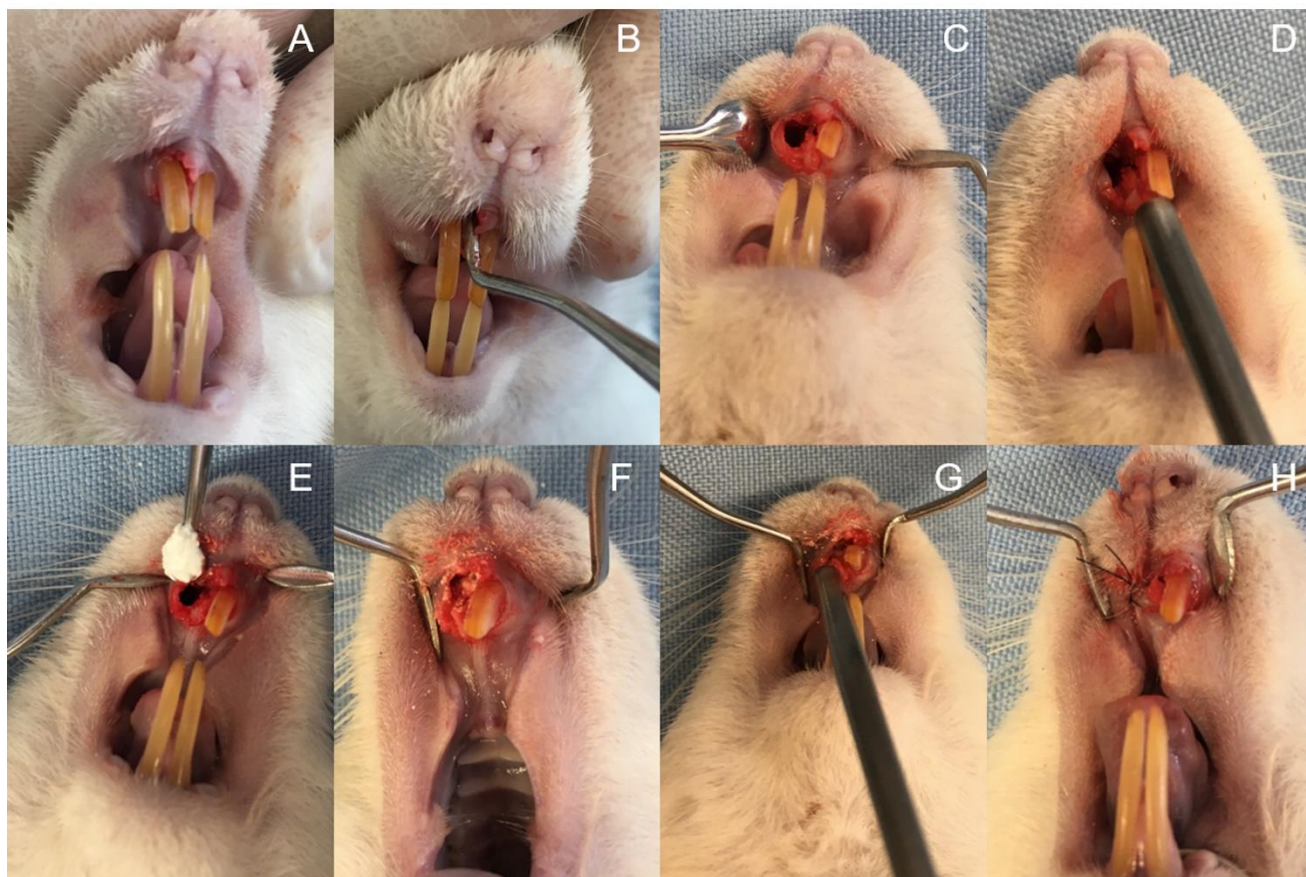
Upon passing through the initial quality check, your paper will be assigned to the Editor-in-Chief who will make an initial evaluation of the suitability of the paper for peer review. If the Editor-in-Chief determines that the paper is not suitable for peer review, for any reason, the paper will receive an immediate Editor Rejection. Should it be determined that the paper can be reviewed, reviewers will be assigned. JOI requires two reviews for each paper; however, the Editor-in-Chief may decide to send the paper to additional reviewers if necessary. Once the reviews have been submitted, a decision will be made. Each paper will receive one of the following four decisions:

- Accept. Congratulations! Your paper has been accepted for publication and will be published in the next available issue.
- Major Revision. For this decision type, the Editor-in-Chief has significant changes that you will need to make before your paper can be reconsidered for publication. In

most cases, revisions of papers with Major Revision decisions will be sent to the original reviewers for re-review.

- Minor Revision. For this decision type, the Editor-in-Chief has minor changes that you will need to make before your paper will be accepted for publication. In some cases, revisions of papers with Minor Revision decisions will be sent to the original reviewers for re-review.
- Reject. A reject decision indicates that the paper is unsuitable for publication in JOI.

ANEXO D – Ilustrações das fases cirúrgica e/ou laboratorial da metodologia experimental ou algo equivalente. Outras ilustrações, tais como: gráficos, tabelas com os dados dos trabalhos e outras informações que não fazem parte do artigo a ser enviado para publicação



Fotografias trans-operatório. Após anestesia e antissepsia com lorexidina 2%, foi feito sindesmotomia (A), luxação do incisivo superior direito com Hollemback (B). Em seguida, os animais foram separados em grupos de acordo com os tratamentos anteriormente descritos em “Materiais e métodos”: em (C) grupo CO- controle, preenchimento com coágulo; em (D), grupo LS- laserterapia, onde observa-se a ponteira do laser sobre o alvéolo (aplicação direta); em (E), BTF- aplicação de β -tricálcio-fosfato em pasta com grânulos pequenos; em (F) observa-se o alvéolo preenchido com o biomaterial e, em (G), grupo BTFL, no qual, após preenchimento com biomaterial, foi feita aplicação de laser; em (H), síntese com ponto simples.