



**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS**  
**CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Vanessa Dalapria**

**Estudo do impacto da fotobiomodulação na qualidade óssea de alvéolo  
dental de ratos *Wistar* pós exodontia associada ou não à biomaterial  
*scaffold*.**

**São Paulo, 28 de fevereiro de 2020.**



**Vanessa Dalapria**

**Estudo do impacto da fotobiomodulação na qualidade óssea de alvéolo dental de ratos *Wistar* pós exodontia associada ou não à biomaterial *scaffold*.**

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção de título de Mestre em Biofotônica aplicada às ciências da saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Melo Deana.

**São Paulo, 28 de fevereiro de 2020.**

Dalapria, Vanessa.

Estudos do impacto da fotobiomodulação na qualidade óssea de alvéolo dental de ratos *Wistar* pós exodontia associada ou não à biomaterial *scaffold*. / Vanessa Dalapria. 2020.

97 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

Orientador (a): Prof. Dr. Alessandro Melo Deana.

Regeneração óssea. 2. Laserterapia. 3. Fotobiomodulação.

Sao Paulo, 28 de fevereiro de 2020

**TERMO DE APROVACAO**

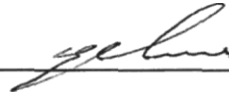
Aluno (a): Vanessa Dalapria

Titulo da Dissertação: "Estudo do impacto da fotobiomodulação na qualidade óssea de alvéolo dental de ratos Wistar pds exodontia associada ou não à biomaterial scaffold"

Presidente: PROF. DR. ALESSANDRO MELO DEANA



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF DR. PAULO SERGIO BOSSINI



## **Agradecimentos**

Muitas pessoas caminharam comigo nesse processo do Mestrado e essa conquista só foi possível porque elas estavam ali, de diversas maneiras me apoiando, incentivando para que eu concluísse essa etapa importante em minha vida.

Às minhas filhas Mariana e Bruna que são as grandes razões da minha vida para quem eu quero ser melhor sempre. Gratidão pelo apoio e paciência pelo tempo que não pude estar inteira para vocês. Amo vocês imensamente.

Aos meus pais Douglas e Selma que possibilitaram meus estudos sem pouparem esforços me auxiliando financeira e emocionalmente, e com minhas filhas para que eu pudesse estudar.

Ao meu amor, Christian Flohr sempre me encorajando e incentivando em todos os momentos.

Àos meus irmãos Adriana Dalapria Dias, Tatiana Dalapria e Bruno Dalapria pelo carinho e parceria de vida. Adriana você é meu exemplo como profissional e sempre esteve presente acreditando e dando o empurrão final para que muita coisa acontecesse nessa trajetória.

A toda minha família por todo apoio e estímulo; vocês são fundamentais pra mim.

Às grandes amigas que tive a sorte de encontrar nesta vida, por tantos instantes de conversas, ensinamentos, boas risadas e por me trazerem leveza em meio a todo esse intenso processo; Roberta Seixas, Priscilla Scoparo, Renata Sousa, Renata Cançado, Ana Paula Natalizio, Márcia Montanari; Obrigada por tanto.

Às amigas que conquistei ao longo do mestrado: Suzana Polonca, Fernanda Camargo, Grazielly Rodrigues, Silvana Ortega e Roseli Cordon obrigada por dividirem os anseios, aflições, conquistas. Em especial à Grazielly Rodrigues que com sua generosidade, carinho e amizade me ajudou imensamente e foi imprescindível para que pudesse chegar até aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alessandro Melo Deana por me guiar, ensinar e trazer a clareza necessária em cada etapa. Obrigada por toda ajuda e pela sensibilidade em entender meu momento de vida.

Ao Prof. Rodrigo Marcos Labat que em muitos momentos me orientou no projeto do Mestrado e ajudou de maneira ímpar e nos deu o maior exemplo do que é ser um mestre na etapa internacional na Itália.

À Prof<sup>a</sup> Daniela Teixeira que literalmente salvou o projeto no momento em que o aparelho de LED quebrou e foi incansável para consertá-lo e eu não perder tudo que havia feito.

As minhas alunas queridas de Iniciação Científica Ane Caroline Silva, Nathalia Marinheiro, Rayane Santos, Regiane Sales, Lesley de França. Gratidão pela

entrega com que fizeram deste projeto seus também, e foram parceiras dedicadas e incansáveis. Vocês estarão eternamente em meu coração.

Aos dirigentes e coordenadores da Uninove pela oportunidade de aprimoramento profissional com tamanha qualidade. E a todos os professores do programa de pós-graduação do Mestrado da Uninove por serem meus mestres. Especialmente à Prof Dra Sandra Kalil Bussadori e Lara Mota Jansinski que acreditaram em mim e me incentivaram a ingressar no Mestrado.

Às maravilhosas profissionais Nurya Bustamante de Araújo e Vanessa Ferreira da Silvado do Biotério que tanto me ensinaram e ajudaram no trato e respeito aos animais para o sucesso da pesquisa.

E às técnicas do laboratório da pós-graduação, Núbia e Ariane, por todo apoio e disponibilidade em sempre ajudarem em todo processo da pesquisa.

Gratidão à Patrícia de Almeida Mattos, Marília Siena Del Bel e Prof<sup>a</sup> Stella Maris Terena, que foram verdadeiros anjos que com tanta generosidade ajudaram em momentos cruciais nas análises da pesquisa.

Agradeço ainda, imensamente à Priscilla Cunha, secretária do programa de pós-graduação da UNINOVE pela generosidade, gentileza e paciência com que conduz todos os alunos, nos caminhos do curso.

A Carolina Benetti da UFABC pelo apoio na realização da Tomografia de Coerência Óptica e a Vitor Lages da Silva da Lnanno- CNPEM parceiro na análise de Microtomografia, ambas essenciais neste estudo.

## Resumo

O enxerto ósseo adicionado ao alvéolo dentário imediatamente após a extração do dente evita atrofia e deformidade do osso no local da perda do elemento. A fotobiomodulação estimula o fluxo sanguíneo, ativa osteoblastos, diminuiu a atividade osteoclástica e melhora a integração do material do enxerto com o tecido ósseo, acelerando o processo de consolidação óssea. A melhora na qualidade do enxerto ósseo fornece estabilidade e a longevidade aos implantes odontológicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da fotobiomodulação na qualidade óssea de alvéolo dental de ratos *Wistar* pós exodontia associada ou não à biomaterial *scaffold* Straumann® Cerabone®. Análises realizadas: histológicas, tomografia de coerência óptica (OCT), microtomografia (Micro CT) e análise das fosfatases ácida e alcalina. Utilizaram-se 48 animais divididos em 5 grupos (n=12): Basal (sem intervenções); Controle (exodontia); LED (Exodontia e LED  $\lambda = 850$  nm); Biomaterial (Exodontia e biomaterial) e Biomaterial+LED (exodontia, biomaterial e LED  $\lambda = 850$  nm). A eutanásia ocorreu aos 15 e 30 dias. A ALP aos 15 dias melhorou a formação óssea para os grupos Controle e Biomaterial+LED ( $p = 0.0086$  e  $p = 0.0379$ , Bonferroni) e aos 30 dias no grupo LED diante dos demais grupos ( $p = 0.0007$ , Bonferroni), para a AcP todos os grupos obtiveram menor reabsorção comparados ao grupo Basal. Na densidade óssea houve melhora significativa no grupo Biomaterial+LED e Biomaterial em relação aos grupos controle e LED ( $p < 0,05$ , t-test) aos 30 dias. O volume aumentou nos grupos Biomaterial, Biomaterial+LED e Basal em relação ao grupo Controle aos 15 dias ( $p < 0,05$ , t-test). E aos 30 dias o grupo Basal apresenta maior volume diante dos grupos Controle e LED ( $p < 0,05$ , t-test). As análises de OCT e histológica não demonstraram diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ , t-test) entre os grupos nem entre os tempos, mas a análise clínica evidenciou melhora cicatricial e maturação do osso nos grupos com LED. O LED não demonstrou melhora significativa na qualidade óssea alveolar, porém os resultados clínicos sugeriram potencial ação deste tanto para melhora na organização tecidual como para aceleração da maturação do osso permitindo futura discussão e novos estudos que elucidem sua atuação na qualidade do osso alveolar associado ou não à biomaterial *scaffold*.

**Palavras chave:** Regeneração óssea, Laserterapia, Fotobiomodulação, LLLT, Biomaterial.

## Abstract

The bone graft added to the tooth socket immediately after tooth extraction prevents bone atrophy and deformity at the site of the loss of the element. Photobiomodulation speeds up the bone healing process; stimulates blood flow; activates osteoblasts; decreases osteoclastic activity and improves the integration of graft material with bone tissue. The improvement in the quality of the bone graft provides stability and longevity of the implants in oral rehabilitation. The objective of this work was to evaluate the impact of photobiomodulation on the bone quality of dental alveolus of *Wistar* rats after tooth extraction associated or not with the scaffold biomaterial. Histological analyzes, optical coherence tomography, microtomography and analysis of acid and alkaline phosphatases were performed. 48 animals were used, divided into 5 groups (n=12): Basal (without interventions); Control (tooth extraction); LED (Exodontia and LED  $\lambda = 850$  nm); Biomaterial (extraction and biomaterial) and Biomaterial + LED (extraction, biomaterial and LED  $\lambda = 850$  nm). The animals were euthanized in 15 and 30 days. ALP at 15 days improved bone formation for the Control and Biomaterial + LED groups ( $p = 0.0086$  and  $p = 0.0379$ , Bonferroni) and at 30 days in the LED group compared to the other groups ( $p = 0.0007$ , Bonferroni), for ACP all groups obtained less resorption compared to the Basal group. Bone density showed a significant improvement in the Biomaterial + LED and Biomaterial group in relation to the control and LED groups ( $p < 0.05$ , t-test) at 30 days. The volume increased in the Biomaterial, Biomaterial + LED and Basal groups in relation to the Control group at 15 days ( $p < 0.05$ , t-test). And at 30 days, the Basal group had a higher volume compared to the Control and LED groups ( $p < 0.05$ , t-test). The OCT and histological analyzes did not show statistical differences ( $p > 0.05$ , t-test) between the groups or between the times, but the clinical analysis showed healing improvement and bone maturation in the groups with LED. The LED did not show a significant improvement in alveolar bone quality, however the clinical results suggested a potential action for both improving tissue organization and accelerating bone maturation, allowing for future discussion and new studies that elucidate its performance in the quality of alveolar bone associated or not to the *scaffold* biomaterial.

**Keywords:** Bone Regeneration, Laser Therapy, Photobiomodulation, LLLT, Biomaterial.



## Lista de Ilustrações

Figura 1:Micrografia eletrônica de tecido ósseo .....	16
Figura 2: Esquema de ossificação intramembranosa.....	19
Figura 3: Imagem osteoclasto .....	21
Figura 4:Representação canal Havers do tecido ósseo.	
Figura 5: Imagem osso compacto e esponjoso .....	23
Figura 6: Estrutura microscópica do osso cortical. ....	25
Figura 7:Representação da ossificação intramembranosa.....	26
Figura 8: Imagem de ossificação endocrondal .....	27
Figura 9: Figura esquemática do sistema RANK/RANKL.....	29
Figura 10: O ciclo de remodelagem ósseas .....	30
Figura 11: Alteração dimensional do osso alveolar. ....	34
Figura 12: Cicatrização do osso alveolar.....	35
Figura 13: Sistema RANK RANKL OPG .....	36
Figura 14: Desenho demonstrando o implante corretamente instalado .....	37
Figura 15: Classificação da qualidade óssea .....	39
Figura 16:Fotomicrografias: Imagem 3D do Micro CT.....	41
Figura 17: Enxerto ósseo .....	42
Figura 18: Representação do alvéolo pós extração .....	47
Figura 19: Fluxograma dos grupos.....	54
Figura 20: Técnica cirúrgica. ....	56
Figura 21: Tratamento com LED. ....	58
Figura 22: Equipamento de Tomografia de coerência óptica .....	61
Figura 23: Exemplo de seleção da região de interesse na imagem .....	62
Figura 24:Seleção dos pixels de interesse .....	63
Figura 25: Ajuste de uma função exponencial ao gráfico da intensidade.....	64
Figura 26: Especificações do Microtomógrafo.....	65
Figura 27: Imagem de binarização de biomaterial utilizado.....	66
Figura 28: Imagem das lâminas coradas HE.....	67
Figura 29: Imagens das lâminas coradas Picosírius Red.....	68
Figura 30: Imagem das lâminas coradas com Picosírius Red.....	69
Figura 31:Gráfico de médias de fosfatase alcalina dos grupos estudados.....	70
Figura 32: Gráfico de médias de fosfatase ácida dos grupos estudados. ....	71
Figura 33: Fotomicrografia de imagens de OCT aos 15 e 30 dias. ....	72

Figura 34: Médias de reflectividade integrada dos grupos estudados.....	73
Figura 35: Médias do coeficiente de atenuação dos grupos estudados .....	74
Figura 36: Médias de densidade óssea dos grupos estudado .....	75
Figura 37: Médias de volume ósseo dos grupos estudados.....	76
<i>Figura 38: Imagens da análise histopatológica .....</i>	<i>77</i>
Figura 39: Médias de matriz óssea dos grupos estudados .....	78
Figura 40: Médias de não matriz óssea dos grupos estudados. ....	78
Figura 41: Imagens Picrosirius. ....	79
Figura 42: Médias de fibras colágenas entre os grupos estudados.....	80
Figura 43: Médias de fibrilas entre os grupos estudados .....	81

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Controle local da reabsorção óssea .....	31
Tabela 2: Regulação sistêmica de remodelação óssea .....	32
Tabela 3: Materiais de enxerto ósseo.....	44
Tabela 4: Delineamento Experimental.....	54
Tabela 6: Parâmetros dosimétricos empregados com LED.....	58

## Lista de Abreviaturas e Siglas

IGF-S	Fator de crescimento insulínico
PTH	Paratormônio
TGF	Fator de crescimento tumoral
BMP	Proteína morfogenética óssea
OPG	Osteoprotegerina
IL	Interleucina
TNF	Fator de necrose tumoral
PGE2	Prostaglandina E2
RANK	Fator de ativação do receptor de ativação do fator nuclear kappa
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa
PG	Prostaglandina
INF	Interferon
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas humanas
DFDB	Enxerto alógeno humano desmineralizado congelado e seco
FDB	Enxerto alógeno humano congelado e seco
rhBMP	Proteína Morfogenética Óssea Recombinante Humana
HÁ	Hidroxiapatita
$\beta$ TCP	Beta Fosfato Tricálcico
LED	Light EmittingDiode
ATP	Adenosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
OCT	Tomografia de coerência óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
TRAP	Fosfatase ácida tártaro resistente
Micro CT	Microtomografia
ALP	Fosfatase Alcalina
AcP	Fosfatase ácida
VOI	Volume OfInterest
ROI	RegionOfInterest

## **Lista de símbolos e unidades de medidas:**

$\alpha$ - Alfa

$\beta$ - Beta

$\lambda$ - Comprimento de onda

Kg- kilograma

$\mu\text{m}$ - micrometro

mm- milímetro

ml- mililitro

mg- miligrama

$\mu\text{m}$ - micrometro

nm- nanometro

## Sumário

1. Contextualização.....	16
1.1. Tecido ósseo .....	16
1.2. Células do Tecido Ósseo.....	17
<i>Osteócitos</i> .....	17
<i>Osteoblastos</i> .....	18
<i>Osteoclastos</i> .....	18
1.3. Matriz Óssea.....	19
1.5. Tipos de tecido ósseo .....	22
<i>Tecido ósseo primário ou imaturo</i> .....	23
<i>Tecido ósseo secundário ou maduro</i> .....	24
1.6. Histogênese.....	25
<i>Ossificação Intramembranosa</i> .....	25
<i>Ossificação Endocondral</i> .....	26
1.7. Crescimento do osso .....	27
1.8. Plasticidade do tecido ósseo alveolar .....	27
1.9. Remodelação óssea .....	28
1.10. Reparo ósseo .....	31
1.11. Hormônios que atuam nos ossos .....	32
1.12. Dentes e reparo ósseo alveolar.....	33
1.13. Reabilitação com implantes.....	37
Enxerto Ósseo.....	41
1.14. Fotobiomodulação .....	48
2. OBJETIVOS.....	52
2.1. Objetivo geral.....	52
2.2. Objetivos específicos.....	52
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	53

3.1. Ética .....	53
3.2. Animais.....	53
3.3. Delineamento experimental.....	53
3.5. Biomaterial utilizado .....	57
3.6. Fotobiomodulação com LED .....	57
3. 8. Análise Fosfatases Ácida e Alcalina- dosagem de marcadores ósseos (ALP, AcP).....	59
3. 9. Tomografia de Coerência Óptica (Optical Coherence Tomography- OCT) .....	61
<i>Coeficiente de atenuação</i> .....	62
3. 10. Refletividade Integrada.....	64
3. 11. Micro Tomografia (Micro CT).....	64
3. 12. Análise histopatológica.....	66
3. 13. Análise estatística.....	69
4. RESULTADOS .....	70
4.1. Análise fosfatases ácida e alcalina-dosagem de marcadores ósseos(ALP, AcP). 70	
4.2. Tomografia de Coerência Óptica (Optical Coherence Tomography- OCT) 72	
4.3. Microtomografia (Micro CT) .....	74
4.4. Análise Histopatológica .....	76
5. DISCUSSÃO.....	82
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	90
Anexos .....	97
Anexo A.....	97

## 1. Contextualização

### 1.1. Tecido ósseo

O tecido ósseo é o componente principal do esqueleto, serve de suporte para os tecidos moles e protege órgãos vitais. Aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue, proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular<sup>1</sup>.

Além dessas funções, os ossos funcionam como depósitos de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes íons nos líquidos corporais<sup>1</sup>.

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. As células são: os osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz ; os osteoblastos, que sintetizam a parte orgânica da matriz e localizam-se na sua periferia, e os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas que reabsorvem o tecido ósseo, participando dos processos de remodelação dos ossos<sup>1</sup> como demonstrado na Figura 1.



*Figura 1::Micrografia eletrônica de tecido ósseo mostrando um osteócito com seus prolongamentos circundados por matriz <sup>1</sup>*



Todos os ossos são revestidos em suas superfícies externas e internas por membranas conjuntivas que contêm células osteogênicas, o perióstio e o endóstio, respectivamente<sup>1</sup>.

## **1.2. Células do Tecido Ósseo**

### *Célula Osteoprogenitora*

A célula osteoprogenitora geralmente é considerada uma célula em repouso ou de reserva que pode ser estimulada para se transformar em um osteoblasto e produzir matriz óssea. Encontram-se nas superfícies dos ossos durante o crescimento normalmente no adulto durante a remodelação óssea. Compõem a população celular presente na camada mais interna do perióstio, as células endosteais de revestimento das cavidades medulares e as células de revestimento dos canais de Havers e de Volkmann<sup>2</sup>.

No indivíduo maduro, no qual não esteja ocorrendo remodelação óssea, as superfícies ósseas são cobertas por camada de células extremamente achatadas com citoplasma discreto e pouquíssimas organelas além da região perinuclear. Não formam um revestimento completo na superfície óssea, mas nos pontos em que células tem contato umas com a outras podem ser encontradas junções comunicantes. Essas células são as células de revestimento ósseo, são análogas às células osteoprogenitoras, mas provavelmente estão em estado mais quiescente que as localizadas nos pontos onde e esteja ocorrendo crescimento do osso. Acredita-se também que funcionem na manutenção e no suporte nutricional dos osteócitos incluídos na matriz subjacente<sup>2</sup>.

### *Osteócitos*

Os osteócitos são células encontradas no interior da matriz óssea, ocupando as lacunas das quais partem canalículos. São células maduras dos osteoblastos. Cada lacuna contém apenas um osteócito. Dentro dos canalículos os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contato por meio de junções comunicantes, por onde passam pequenas moléculas e íons de um

osteócito para outro. Os osteócitos são essenciais para a manutenção da matriz óssea. Sua morte é seguida por reabsorção da matriz<sup>1</sup>.

### *Osteoblastos*

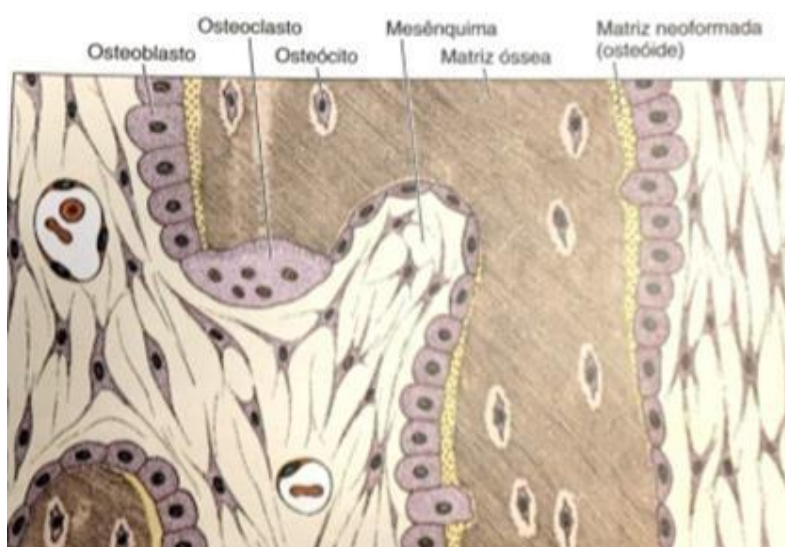
O osteoblasto é responsável pela produção dos constituintes da matriz óssea. Os osteoblastos não funcionam individualmente, mas são encontrados em grupos ao longo da superfície do osso, que alinham na camada da matriz óssea que eles estão a produzir. Eles originam células estaminais mesenquimais multipotentes, que têm a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos, os adipócitos, condrócitos, mioblastos, fibroblastos. Perto do fim do período de secretoras de matriz, 15% de osteoblastos maduros são aprisionadas na nova matriz óssea e diferenciam-se em osteócitos. Pelo contrário, algumas células permaneçam na superfície óssea, tornando-se células de revestimento planas<sup>3</sup>.

Os osteoblastos são células que sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas) da matriz óssea. Sintetizam também osteonectina e osteocalcina. Osteonectina facilita a deposição de cálcio e osteocalcina produzida é transportada pelo sangue, atua nos osteoblastos locais como nos localizados à distância. Os osteoblastos são capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Uma vez aprisionado pela matriz recém-sintetizada, o osteoblasto passa a ser chamado osteócito<sup>1</sup>.

### *Osteoclastos*

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas e extensamente ramificadas, visto nas **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e **Erro! Fonte de referência não encontrada.** Nas áreas de reabsorção de tecido ósseo encontram-se porções dilatadas de osteoclastos conhecidas como lacunas de Howship. Essas células se originam de precursores mononucleados provenientes da medula óssea que, ao contato com o tecido ósseo, unem-se para formar os osteoclastos multinucleados<sup>1</sup>. Os osteoclastos reabsorvem osso pela acidificação e proteólise de matriz óssea e dos cristais de hidroxiapatita encapsuladas no interior da zona de selagem.

O primeiro processo durante a reabsorção da matriz óssea é a mobilização dos cristais de hidroxiapatita por digestão da sua ligação ao colágeno. Em seguida, as fibras de colágeno residuais são digeridas por catepsinas ou collagenases ativadas e os resíduos desta digestão ou são internalizados ou transportados através da célula e libertada no domínio basolateral. A função dos osteoclastos é regulada tanto por citocinas que agem localmente e por hormônios sistêmicos (calcitonina secretados pela glândula tireóide)<sup>4</sup>. A calcitonina, produzido pelas células parafoliculares da tireóide, inibe a reabsorção da matrizes, portanto, a mobilização do cálcio. A calcitonina tem um efeito inibidor sobre os osteoclastos<sup>1</sup>. O processo de ossificação intramembranosa está demonstrado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**



*Figura 2: Esquema de ossificação intramembranosa. Osteoblastos originados das células do mesênquima sintetizam a matriz orgânica (principalmente colágeno tipo I) que forma uma faixa (osteóide). Logo em seguida o osteóide se mineraliza aprisionando alguns osteoblastos que se diferenciam em osteócitos. A matriz calcificada está representada com um pontilhado, e a matriz recém formada está representada por um tracejado. A parte inferior do desenho mostra osteoblastos sendo envolvidos pela matriz recém formada<sup>1</sup>.*

### 1.3. Matriz Óssea

A matriz de osso é composta principalmente por fibras de colágeno do tipo I (que consistem em duas cadeias  $\alpha 1$  e uma cadeia  $\alpha 2$ ) e as proteínas não colagenosas, e representa cerca de 90% da composição orgânica de todo o tecido ósseo. Dentro de osso lamelar, as fibras formam arcos que permitem que a maior densidade de colágeno por unidade de volume de tecido. As lamelas podem funcionar em paralelo uns com os outros (osso trabecular e

periósteo), ou ser concêntrico em torno de um canal centrado sobre um vaso sanguíneo (sistema Haversiano do osso cortical)<sup>5</sup>.

O tecido ósseo apresenta um componente de fibra colágena como substância-base, em sua maior parte formada por fosfato de cálcio e um componente celular de osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células indiferenciadas<sup>6</sup>.

O colágeno é o elemento estrutural que absorve a maior parte da sobrecarga de tensão<sup>7</sup>. Não obstante, o colágeno não apresenta propriedades mecânicas equivalentes quando tencionado em diferentes direções, sendo denominado de “anisotrópico”. Anisotropia significa que as propriedades mecânicas não são iguais em todas as direções, sendo essa uma característica do osso cortical. A organização óssea com camada de fibrilas colágenas cursando em diferentes direções, permite ao osso ser fortalecido pela tensão em vários planos. Esse fortalecimento progressivo das camadas de tecido ósseo aumenta a resistência e rigidez. As fibras colágenas são organizadas de forma diferente, de acordo com as forças que a região sofre<sup>6</sup>.

Os cristais de hidroxiapatita  $[3Ca_3 (PO_4)_2 (OH)_2]$  são encontrados nas fibras de colágeno, no seu interior, e na matriz, e tendem a ser orientados na mesma direção como as fibras de colágeno. O papel de várias proteínas não colagenosas presentes na matriz óssea não foi completamente explicado. A principal proteína não colagenosa produzida é osteocalcina (proteína Gla), o qual desempenha um papel na ligação de cálcio, estabilização de hidroxiapatita na matriz, e regulação da formação de osso<sup>5</sup>. A proteína Gla é um regulador negativo da formação óssea, que parece inibir a mineralização prematura. Em contraste, biglicano, um proteoglicano, é expressa na matriz óssea e regula positivamente a formação de osso<sup>8</sup>.

A parte inorgânica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea. Os íons mais encontrados são o fosfato e o cálcio. Há também bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato em pequenas quantidades. Os cristais que se formam pelo cálcio e pelo fósforo têm a estrutura da hidroxiapatita. Os íons da superfície do cristal de hidroxiapatita são hidratados, e facilita a troca de íons entre o cristal e o líquido intersticial<sup>1</sup>. As glicoproteínas do osso podem ter

alguma participação na mineralização da matriz. A associação de hidroxiapatita à fibras colágenas é responsável pela rigidez e resistência do tecido ósseo<sup>1</sup>.



*Figura 3: Imagem osteoclasto. Corte mostrando três osteoclastos (Setas) digerindo matriz óssea. Notar o compartimento claro onde tem lugar a erosão da matriz. Esse compartimento é acidificado por uma bomba de prótons localizada na membrana do osteoclasto e é o local onde tem lugar a dissolução dos minerais e digestão da matriz orgânica<sup>1</sup>*

Ao redor de cada osso compacto, existe uma membrana de tecido conjuntivo osteogênico (células formadoras de osso), denominada periósteo, que consiste em duas camadas. A camada interna, próxima à superfície óssea, é mais rica em células, principalmente precursoras de células ósseas, e um rico suprimento vascular, enquanto a camada mais externa é mais fibrosa. A superfície interna do osso compacto, assim como do osso esponjoso são recobertas por única camada de células ósseas, o endósteo, que fisicamente separa a superfície óssea da medula óssea contida em seu interior<sup>9</sup>.

#### **1.4. Irrigação sanguínea**

A irrigação do tecido ósseo é essencialmente centrífuga, partindo da cavidade medular, passando pelo tecido ósseo e saindo através dos vasos do periósteo. As artérias do periósteo realmente entram no tecido ósseo, mas quase exclusivamente na epífise e em locais onde há inserção de tendões e ligamentos no osso. As artérias nutrientes que irrigam a diáfise e a epífise tem

origem, durante o desenvolvimento, como o vaso principal de um broto de periósteo, a partir do qual se desenvolvem os centros primários e secundários de ossificação<sup>1</sup>.

No que diz respeito à nutrição do tecido ósseo em si, os canais de Volkmann representam a principal via de anastomose no interior do osso compacto. Os vasos sanguíneos menores entram no canal de Havers, conforme Figura 4, onde se pode encontrar uma arteríola e uma vênula e, outras vezes, só um capilar. Dos vasos do periósteo chega uma irrigação bem menor, mas em geral, ela serve apenas as porções realmente exteriores do osso compacto. Deve-se notar também que o tecido ósseo não tem vasos linfáticos e só o tecido do periósteo tem drenagem linfática<sup>1</sup>.

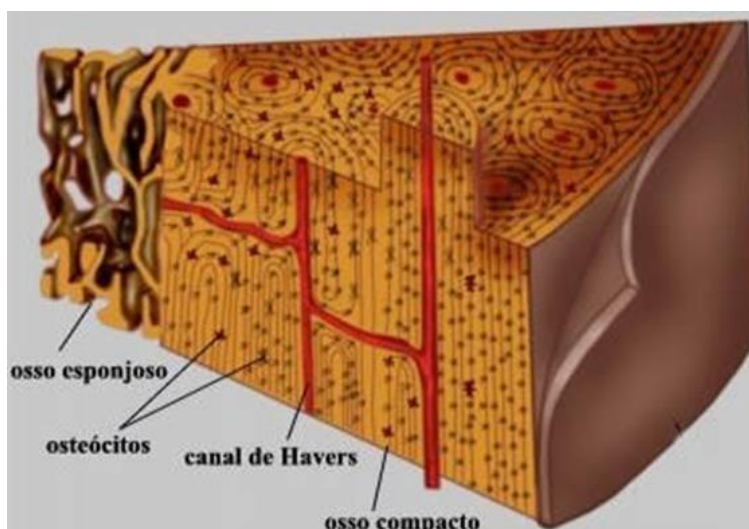


Figura 4: Representação canal Havers do tecido ósseo. Esquema simplificado do processo de remodelação óssea<sup>10</sup>.

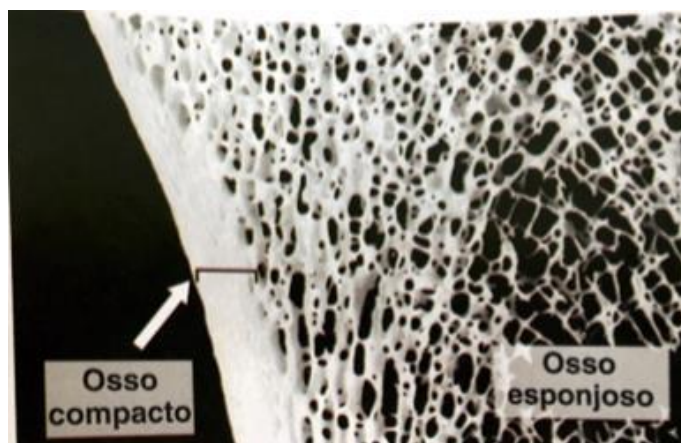
### 1.5. Tipos de tecido ósseo

Macroscopicamente classifica-se em: Osso Compacto formado por partes de cavidades visíveis e Osso Esponjoso formado por partes com muitas cavidades intercomunicantes<sup>11, 12</sup> visto na Figura 5.

Nos ossos longos as extremidades são chamadas de epífises formadas por osso esponjoso com uma delgada camada superficial compacta. A diáfise é quase totalmente compacta, com pequena quantidade de osso esponjoso na

sua parte profunda, delimitando o canal medular. Principalmente nos ossos longos, o osso compacto é chamado de osso cortical<sup>8, 9</sup>.

As cavidades do osso esponjoso e o canal medular da diáfise dos ossos longos são ocupados pela medula óssea<sup>9, 10</sup>.



*Figura 5: Imagem osso compacto e esponjoso. Corte grosso de um osso seco, mostrando o osso mais interno esponjoso e o cortical compacto<sup>1</sup>.*

O tecido ósseo pode ser classificado em primário (imaturo) que se apresenta com disposição irregular, não organizada das fibras colágenas e menor quantidade de cristais de hidroxiapatita. Está presente no feto, no calo ósseo, nas osteomielites, nos tumores ósseos e na doença óssea de Paget. É classificado também como secundário (maduro, haversiano ou lamelar), com fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas ou concêntricas em torno dos canais de Harvers, formando osso compacto ou esponjoso. Geralmente, sobre a superfície do tecido ósseo, deposita-se uma camada de matriz denominada osteóide, que se caracteriza por uma matriz não mineralizada, contendo grande quantidade de fibras colágenas tipo I produzidas pelos osteoblastos. Assim, ao microscópio de luz, o osteóide apresenta aspecto amorfo e eosinofílico; além de ser encontrado em situações fisiológicas, também é encontrado nos tumores formadores de tecido ósseo<sup>9, 10</sup>. O tecido ósseo tem dois componentes básicos: células e matriz orgânica, sobre a qual se depositam os componentes inorgânicos.

*Tecido ósseo primário ou imaturo*

Em cada osso o primeiro tecido ósseo que aparece é do tipo primário (não lamelar), sendo substituído gradativamente por tecido ósseo lamelar ou secundário. No adulto é muito pouco frequente, persistindo apenas próximo às suturas do crânio, nos alvéolos dentais e em alguns pontos de inserção dos tendões<sup>1</sup>.

O tecido ósseo primário apresenta fibras colágenas dispostas em várias direções sem organização definida, tem menor quantidade de minerais e maior proporção de osteócitos do que o tecido ósseo secundário<sup>1</sup>.

#### *Tecido ósseo secundário ou maduro*

O tecido ósseo secundário (lamelar) é a variedade geralmente, encontrada no adulto. Sua principal característica é conter fibras colágenas organizadas em lamelas de 3 a 7  $\mu\text{m}$  (micrômetro) de espessura, que ficam paralelas umas às outras ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando os sistemas de Havers ou ósteons, vide Figura 6. Cada sistema de Havers ou ósteon é um cilindro longo formado por 4 a 20 lamelas ósseas concêntricas. No centro desse cilindro ósseo existe um canal revestido de endóstio, o canal de Havers, que contém vasos e nervos. Os canais de Havers comunicam-se entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa do osso por meio de canais transversais ou oblíquos, os canais de Volkmann. Todos os canais vasculares existentes no tecido ósseo aparecem quando a matriz óssea se forma ao redor dos vasos preexistentes<sup>1</sup>.



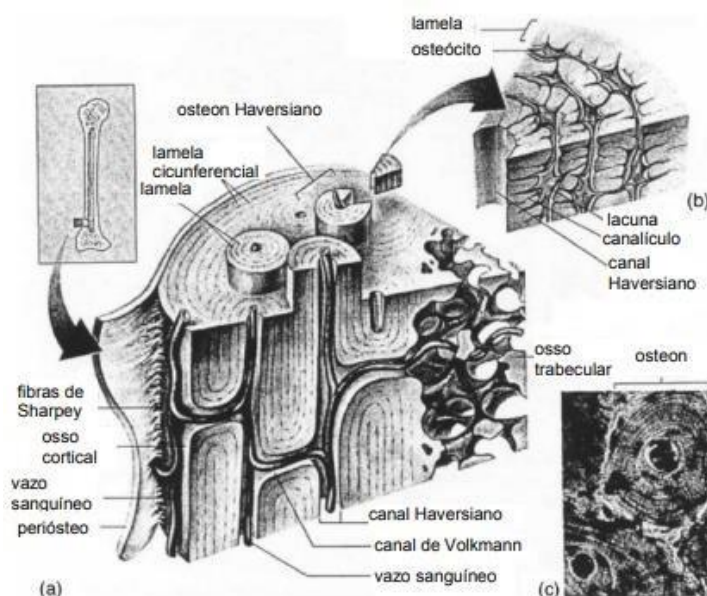


Figura 6: Estrutura microscópica do osso cortical. a) Esboço 3D do osso cortical b) corte do sistema Haversiano c) fotomicrografia do sistema Haversiano<sup>13</sup>

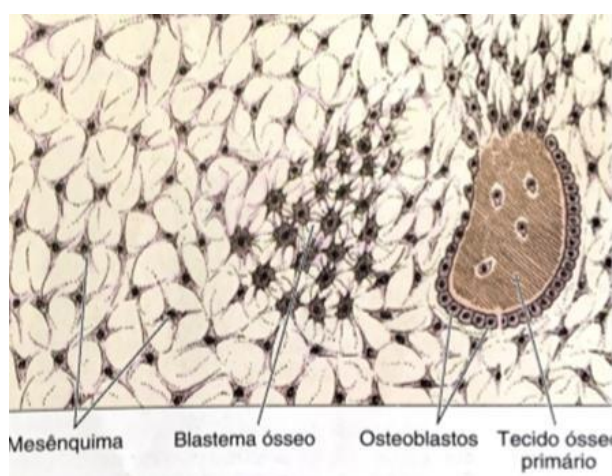
## 1.6. Histogênese

Embora histologicamente um osso não seja diferente de outro, a formação óssea ocorre por três mecanismos: (1) endocrondal; (2) intramembranosa; (3) sutural. A ossificação endocrondal ocorre no interior de um molde de cartilagem que é substituído por osso. A ossificação intramembranosa faz-se diretamente dentro de uma membrana conjuntiva (mesênquima). A ossificação sutural é um caso especial, formando-se o osso ao longo de bordas de uma sutura<sup>9</sup>.

### *Ossificação Intramembranosa*

A ossificação intramembranosa ocorre no interior de membranas de tecido conjuntivo, de acordo com Figura 7. é o processo formador dos ossos frontal, parietal e de partes do occipital, do temporal e dos maxilares superior e inferior. Contribui também para o crescimento dos ossos curtos e para o aumento em espessura dos ossos longos<sup>1</sup>. Esse tipo de ossificação ocorre normalmente nas camadas mais profundas da derme, e os ossos que dele resultam são chamados de ossos dérmicos, ou ossos membranosos. A ossificação intramembranosa começa aproximadamente na oitava semana do desenvolvimento embrionário<sup>14</sup>.

O processo tem início pela diferenciação de células mesenquimatosas que se transformam em grupos de osteoblastos, os quais sintetizam o osteóide (matriz ainda não mineralizada), que logo se mineraliza, englobando alguns osteoblastos que se transformam em osteócitos. Como vários desses grupos surgem quase simultaneamente no centro de ossificação, há confluência das traves ósseas formadas, conferindo ao osso um aspecto esponjoso. Entre as traves formam-se cavidades que são penetradas por vasos sanguíneos e células mesenquimais indiferenciadas, que darão origem à medula óssea<sup>1</sup>.



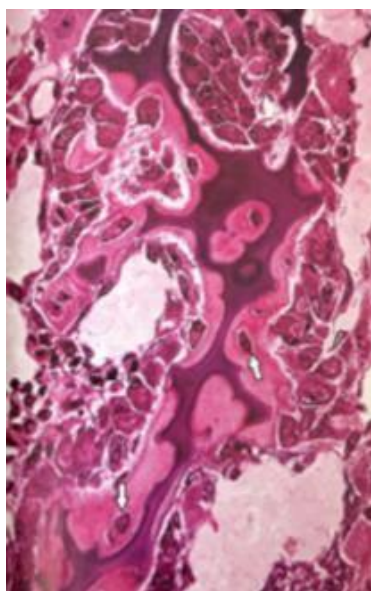
*Figura 7: Representação da ossificação intramembranosa. Células do mesênquima se tornam arredondadas e formam um blastema no qual, por diferenciação, originam-se osteoblastos que produzem tecido ósseo primário<sup>1</sup>.*

### *Ossificação Endocondral*

A ossificação endocondral tem início sobre uma peça de cartilagem hialina, de forma parecida à do osso que se vai formar, porém de tamanho menor. Esse tipo de ossificação é o principal responsável pela formação dos ossos curtos e longos demonstrado na Figura 8.

A ossificação endocondral consiste essencialmente em dois processos. Primeiro, a cartilagem hialina sofre modificações, havendo hipertrofia dos condrócitos, redução da matriz cartilaginosa a finos tabiques, sua mineralização e a morte dos condrócitos por apoptose. Segundo, as cavidades previamente ocupadas pelos condrócitos são invadidas por capilares sanguíneos e células osteogênicas vindas do conjuntivo adjacente. Essas

células se diferenciam em osteoblastos, que depositarão matriz óssea sobre os tabiques de cartilagem calcificada<sup>1</sup>. Por volta da sexta semana de desenvolvimento do embrião, tanto o úmero (membro superior) como o fêmur (membro inferior), estão formados e são constituídos de cartilagem<sup>14</sup>.



*Figura 8: Imagem de ossificação endocrondal. Notar os restos de matriz cartilaginosa calcificada (roxo escuro) envoltas por tecido ósseo que aparece com uma coloração clara. Na matriz do tecido ósseo podem ser observados diversos osteócitos (setas brancas).*

### **1.7. Crescimento do osso**

O crescimento dos ossos consiste na formação de tecido ósseo novo, associado à reabsorção parcial de tecido já formado, deste modo, os ossos conseguem manter a sua forma enquanto crescem<sup>1</sup>. Nos adultos também existe remodelação dos ossos, um processo fisiológico que ocorre simultaneamente em diversas partes do esqueleto<sup>1</sup>. Apesar da sua resistência às pressões e sua rigidez, o tecido ósseo é muito plástico, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta às modificações nas forças a que está submetido<sup>1</sup>.

### **1.8. Plasticidade do tecido ósseo alveolar**

A posição dos dentes na arcada dentária pode ser modificada por pressões laterais exercidas por aparelhos ortodônticos. Ocorre reabsorção óssea no lado em que a pressão da raiz do dente atua sobre o osso alveolar e neoformação óssea do lado oposto, que está sujeito a uma tração por meio do ligamento

periodontal. Desse modo, o dente é deslocado na arcada dentária, à medida que o osso alveolar é remodelado. Este é um exemplo da plasticidade do tecido ósseo, apesar das características da rigidez desse tecido<sup>1</sup>.

### **1.9. Remodelação óssea**

O esqueleto é um órgão metabolicamente ativo que sofre remodelação contínua ao longo da vida. O remodelamento ósseo envolve a remoção de osso mineralizado por osteoclastos, seguida pela formação de matriz óssea através dos osteoblastos que subsequentemente se tornam mineralizados. O ciclo de remodelação consiste em três fases consecutivas: reabsorção, durante a qual os osteoclastos digerem o osso antigo; reversão, quando as células mononucleares aparecem na superfície óssea; e formação, quando os osteoblastos colocam um novo osso até que o osso reabsorvido seja completamente substituído<sup>15</sup>.

A remodelação óssea serve para ajustar a arquitetura óssea para atender às necessidades mecânicas e ajudar a reparar microdanos na matriz óssea, evitando o acúmulo de osso velho. Também desempenha um papel importante na manutenção da homeostase do cálcio plasmático. A regulação do remodelamento ósseo é sistêmica e local. Os principais reguladores sistêmicos incluem o paratormônio (PTH), o calcitrol e outros hormônios, como o hormônio do crescimento, os glicocorticoides, os hormônios da tireoide e os hormônios sexuais.

Fatores de crescimento insulínicos (IGFs), prostaglandinas, fator de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ ), proteínas morfogenéticas ósseas (BMP's) e citocinas estão, também, envolvidos. O sistema de osteoprotegerina (OPG) o processo de absorção e formação de tubos é etereamente acoplado, permitindo a formação de ossos para acompanhar o ciclo de absorção dos tubos, mantendo a integridade esquelética<sup>15</sup>, conforme Figura 9.

Em relação a homeostase óssea, moléculas como a interleucina IL-1 $\beta$ , o TNF- $\alpha$  (fator de crescimento tumoral) e a PGE2 (prostaglandina E2) estimulam a produção de RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa) nos

osteoblastos. O RANKL, liga-se ao receptor RANK (fator de ativação do receptor de ativação do fator nuclear kappa) presente nos osteoclastos precursores, promovendo sua diferenciação, aumentando a reabsorção óssea (Figura 1). Já a OPG, pode impedir esta ligação com o RANK, ao ligar-se ao RANKL, antagonizando seu efeito (Figura 9). Assim, uma alta concentração de OPG faz com que o RANKL esteja menos disponível para ligação com o RANK e favorece o aumento da massa óssea. Por outro lado, uma baixa concentração de OPG faz com que o RANKL se torne mais disponível para a ligação com o RANK favorecendo a reabsorção e diminuição da massa óssea. A concentração de OPG produzida regula a massa óssea, acredita-se que a OPG possa ter efeito ósseo protetor no organismo<sup>16</sup>.

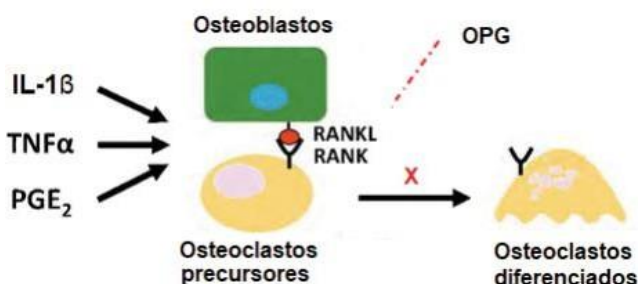


Figura 9: Figura esquemática do sistema RANK/RANKL nos ossos. Citocinas pró inflamatórias como IL-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$  e outros mediadores como PGE, são capazes de aumentar a expressão de RANKL em osteoblastos, facilitando sua ligação com o receptor RANK, promovendo assim a diferenciação de osteoclastos precursores, aumentando a reabsorção óssea. A OPG é capaz de se ligar ao RANKL, bloqueando a ligação deste com o receptor RANK, impedindo assim a diferenciação de osteoclastos precursores e favorecendo a formação óssea<sup>17</sup>.

A maioria dos fatores que controla a reabsorção óssea age diretamente nos osteoblastos, tais como PTH (paratormônio), 1, 25 dihidroxivitamina D3, esteróides sexuais, prostaglandinas (PGs), citocinas (Interleucina-1, Interleucina-6 e Interleucina-11), TGF- $\beta$ . Portanto, estes fatores estimulam os osteoblastos a liberarem moléculas que estimulam a migração e adesão à superfície óssea que deve ser reabsorvida. Sendo assim, os osteoblastos participam do processo de remodelação óssea, não somente produzindo matriz óssea, mas também controlando a atividade dos osteoclastos<sup>18, 19</sup>.

As citocinas e os fatores de crescimento, especialmente o TGF- $\beta$ , liberados da matriz durante sua degradação, atuam como uma alça de “feed-back” e

desencadeiam a formação e ativação de osteoblastos para sintetizar e depositar uma quantidade equivalente de osso novo na lacuna de reabsorção<sup>18, 19</sup>. As células T expressam RANK, RANKL, INF (interferon) entre outras citocinas, participando ativamente no processo de osteoclastogênese, sendo que o equilíbrio da produção destas citocinas é primordial no balanço da remodelação óssea, já que determinam o equilíbrio entre osteoblastos e osteoclastos<sup>20</sup> conforme demonstrado na Figura 10.

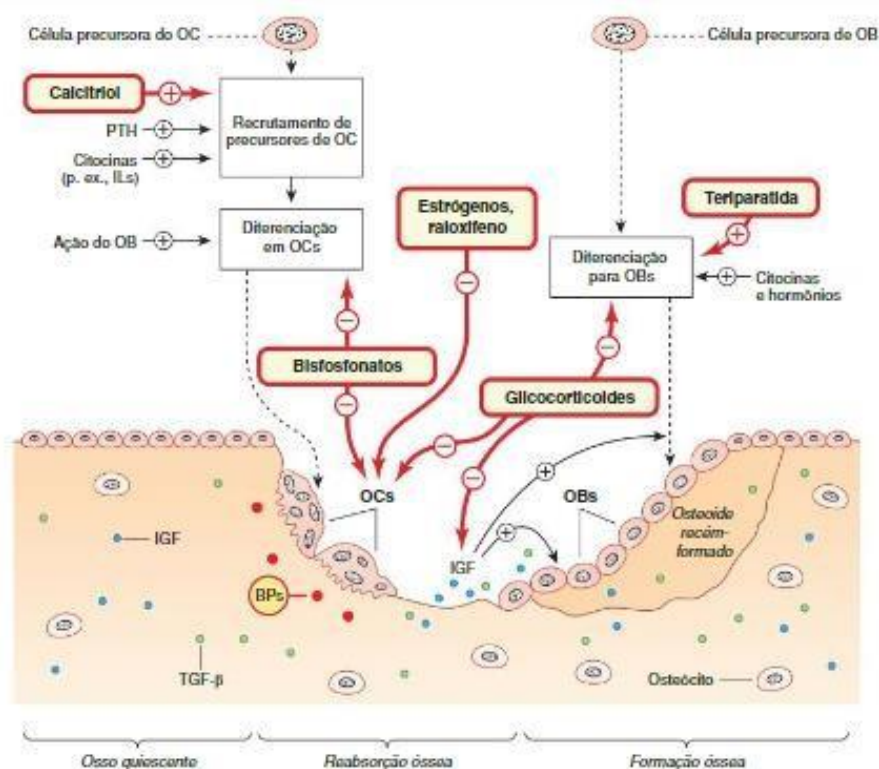


Figura 10: O ciclo de remodelação óssea e a ação dos hormônios, citocinas e fármacos<sup>21</sup>.

A Figura 10, mostra o osso trabecular quiescente. As citocinas, como fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e fator de crescimento transformador (TGF-β), mostrados como pontos estão incrustadas na matriz óssea. Na reabsorção óssea, células precursoras de osteoclastos (OC), recrutadas por citocinas e hormônios, são ativadas pelos osteoblastos (Obs) para formar Ocs multinucleados móveis que se deslocam da superfície óssea, reabsorvendo osso e liberando as citocinas fixadas. Na formação óssea a liberação de citocinas recruta Obs, que formam o osteóide e fixam citocinas IGF e TGF-β.

Alguns Obs também se formam incrustrados, formando osteócitos terminais (que, atualmente, sabemos não serem sem função).

O osteóide então se torna mineralizado, e as células e o revestimento celular cobrem a área (não mostrada). Os estrógenos causam apoptose (morte celular programada) dos OCs. Observe que as concentrações farmacológicas de glicocorticóides apresentam efeitos especificados acima, mas concentrações fisiológicas são necessárias para a diferenciação dos OBs. BPs, bifosfonatos incrustrados- estes são ingeridos pelos Ocs quando osso é reabsorvido (não mostrado); IL, interleucina; PTH, paratormônio<sup>21</sup>, esse controle de reabsorção óssea pode-se observar na tabela 1.

*Tabela 1: Controle local da reabsorção óssea*

<b>Fatores</b>	<b>Efeitos</b>
<b>IL-1, IL-6, IL-11, TNF, IFN, GM-CSF, TGF-<math>\beta</math>, FGF, PTHrP e PTH</b>	<b>Citocinas que aumentam a perda de massa óssea</b>
<b>IL-4, IL-13, IL-18, IFN, OPG</b>	<b>Citocinas que podem prevenir e perda de massa óssea</b>
<b>M-CSF e GM-CSF, prostaglandinas, leucotrienos, NO e os fatores de crescimento IGF, TGF-<math>\beta</math>, FGF, PTHrPt</b>	<b>Fatores locais que atuam de diversas maneiras nas células óssea</b>

Fonte: Adaptação Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva<sup>22</sup>

### **1.10. Reparo ósseo**

O reparo do tecido ósseo lesado geralmente leva à formação de um tecido que difere na morfologia ou função do tecido original. Esse tipo de cicatrização é chamado de reparo. Regeneração tecidual, por outro lado, é um termo utilizado para descrever a cicatrização em que ocorre uma completa restauração da morfologia e função do tecido<sup>9</sup>.

No tecido ósseo ocorre tanto o fenômeno de regeneração como do reparo, dependendo das características da injúria. Por exemplo, uma pequena fratura óssea (fratura de galho verde), apropriadamente estabilizada, irá cicatrizar por regeneração, enquanto um defeito extenso no osso irá frequentemente cicatrizar por reparo<sup>9</sup>.

### 1.11. Hormônios que atuam nos ossos

Além do hormônio das paratireóides e da calcitonina produzida pela tireóide, ambos já mencionados, diversos outros hormônios atuam no tecido ósseo<sup>1</sup>.

A parte anterior da hipófise produz o hormônio do crescimento, que estimula o crescimento em geral, tendo efeito particularmente acentuado sobre a cartilagem epifisária. Todavia, os efeitos desse hormônio não são diretos. Ele estimula certos órgãos, principalmente o fígado, a sintetizar polipeptídeos denominados somatomedinas, que tem efeito sobre o crescimento e produz o nanismo hipofisário. Sua produção excessiva, como ocorre em alguns tumores da hipófise, causa o gigantismo por exemplo<sup>1</sup>.

Os hormônios sexuais, tanto masculinos (testosterona) como femininos (estrógenos), tem um efeito complexo sobre os ossos, sendo, de um modo geral, estimuladores da formação de tecido ósseo. Esses hormônios influem sobre o aparecimento e desenvolvimento dos centros de ossificação<sup>1</sup> vide Tabela 2.

Tabela 2: Regulação sistêmica de remodelação óssea.

Fatores	Efeito sobre a reabsorção óssea	Efeito sobre a Formação Óssea
PTH	Aumenta	Diminui
1, 25- diidroxivitamina D	Aumenta	Aumenta (porém altas doses inibem a síntese de colágeno)
Calcitonina	Diminui	Aumenta
Estrógeno	Diminui	Diminui um pouco
GH/IGF	Aumenta	Aumenta
T <sub>3</sub> e T <sub>4</sub> (hormônios de tireóide)	Aumentam	Aumentam
Glicocorticóides	Aumentam (inibem a absorção de cálcio e a produção de hormônios sexuais)	



Uma das formas de avaliar a formação e reabsorção óssea é com as análises das fosfatases alcalina e ácida. Os OB secretam matriz óssea rica em proteínas colágenas (Colágeno Tipo-I) e proteínas não colágenas como a Osteocalcina (Bone Gla-Protein) que é uma proteína com alta afinidade pelo Cálcio(Ca) que é usado na formação dos cristais de hidroxiapatita e está diretamente relacionada com a mineralização óssea; a Fosfatase Alcalina (ALP) permite a liberação do grupo fosfato ( $PO_4$ ) para ser usado na formação dos cristais de hidroxiapatita; a Osteoprotegerina (OPG) que fica na superfície dos OB e atua como osteoprotetora se ligando ao RANKL (Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa- $\beta$ ) impedindo sua interação com RANK (Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa- $\beta$ ) que está presente na superfície dos osteoclastos (OC) e assim inibe sua maturação e ativação<sup>23</sup>.

Outra célula que está envolvida no remodelamento e são responsáveis pela reabsorção óssea é o OC que deriva de células hematopoiéticas da medula óssea (monócitos) que se diferenciam em pré osteoclastos mononucleares e através da interação RANK/RANKL formam OC maduros multinucleados que tem uma superfície ativa, com prolongamentos (pregas) que ficam em contato com a matriz óssea. Esta área é a zona clara que fica selada pela integrina e onde agem as enzimas lisossomais como a ACP (Fosfatase Ácida Tartarato Resistente-TRAP) que tornam o meio ácido facilitando a ruptura da hidroxiapatita e liberando o cálcio que fica aprisionado em vesículas dentro do OC e depois estas vesículas são liberadas no plasma sanguíneo. As depressões da matriz escavadas pela ação enzimática são conhecidas como Lacunas de Howship. Sua atividade aumenta com as citocinas IL-1 e IL-6, TNF- $\alpha$ , M-CSF, PTH, vitamina D e é inibida pela CALC, OPG e pelo estrógeno<sup>24</sup>.

### **1.12. Dentes e reparo ósseo alveolar**

Segundo pesquisa no Brasil, a perda dentária ainda é um problema de saúde pública com alta prevalência e impactos negativos na vida dos indivíduos, apesar da possibilidade de controle por meio de tecnologias preventivas e reabilitadoras voltadas à promoção da saúde bucal<sup>25, 26</sup>.

A perda dentária pode gerar impactos negativos na qualidade de vida dos indivíduos, influenciando em sua autoestima e acarretando desordens funcionais, nutricionais e estéticas<sup>27, 28</sup>.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a perda dentária como um problema de saúde pública mundial que deve ser considerado na formulação das políticas de saúde<sup>29</sup>.

O processo alveolar nos quais os elementos dentários estão alojados, é um tecido dento dependente e se desenvolve em conjunto com a erupção dos dentes. Sua arquitetura é orientada pelo eixo de erupção, formato dos dentes e eventual inclinação dos mesmos<sup>30, 31, 32</sup>.

A perda deste elemento dentário provocará mudanças acentuadas no sítio edêntulo como a reabsorção e remodelamento do processo alveolar levando à atrofia no local do elemento perdido, é um processo natural e fisiológico inerente ao processo de cicatrização<sup>30, 33, 34, 35, 36, 37, 38</sup> representado na Figura 11.



*Figura 11: Alteração dimensional do osso alveolar após perda do elemento dentário<sup>39</sup>.*

Após a extração dos dentes o alvéolo é preenchido de sangue e um coágulo é formado. Células inflamatórias migram para o interior do coágulo, e o processo de limpeza do defeito é iniciado. Um tecido vascular e células mesenquimais invadem o coágulo e um tecido de granulação será produzido. Este tecido de granulação será gradualmente substituído por um tecido conjuntivo provisório, e a formação de um novo tecido ósseo (osso primário) é iniciado. O alvéolo

será preenchido gradualmente por esse osso primário, que posteriormente sofre um modelamento e remodelamento, transformando-se em um osso lamelar e medular<sup>36</sup>. **Erro! Indicador não definido.**, demonstrado na Figura 12. A formação óssea começa cerca de 10 dias após a extração do dente; depois de 10 a 12 semanas, o local da extração não pode mais ser identificado<sup>9</sup>.

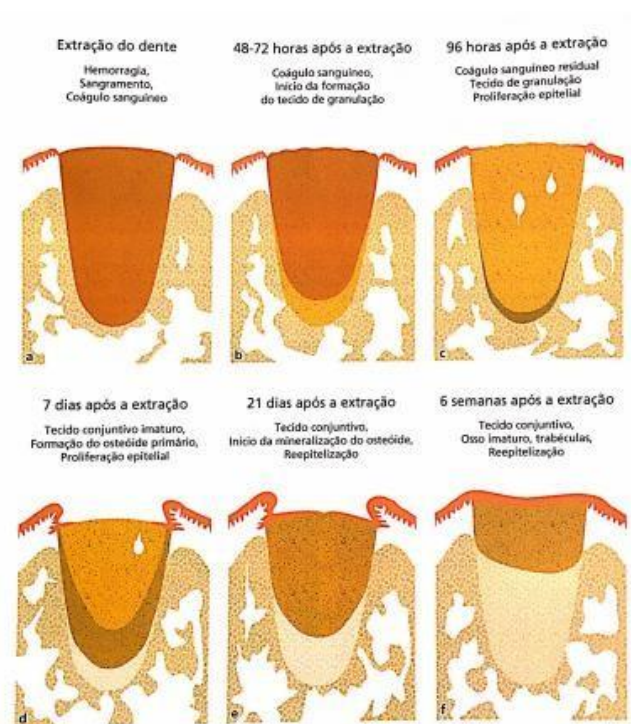


Figura 12: Cicatrização do osso alveolar. (a) Sangramento e formação do coágulo sanguíneo imediatamente após a extração do dente. Vasos sanguíneos são fechados por trombos e uma rede de fibrina é formada. (b) já durante as primeiras 48 horas, granulócitos, monócitos, e fibroblastos começam a migrar através da rede de fibrinas. (c) O coágulo sanguíneo é lentamente substituído por tecido de granulação. (d) Tecido de granulação é formado predominantemente no terço apical do alvéolo. Aumento da densidade dos fibroblastos. Após 4 dias, contração do coágulo e início da proliferação do epitélio oral. Osteoclastos são visíveis na margem do alvéolo. Osteoblastos e osteóide vistos próximos ao fundo do alvéolo.

(Reorganização do tecido de granulação com formação de trabécula osteóide. Proliferação epitelial da margem do defeito no topo do tecido conjuntivo jovem. Novamente, a formação de trabécula osteóide é evidente da parede do alvéolo em direção coronária. Após 3 semanas, várias trabéculas começam a se mineralizar. (f) Radiograficamente, a formação óssea pode ser visível. O tecido mole fecha o ferimento e se epiteliza após 6 semanas. Entretanto, o preenchimento ósseo no alvéolo leva 4 meses e não alcança o nível do dente vizinho. (Lindhe J, Lang NP, 2015)**Erro! Indicador não definido.**

As principais alterações que acometem o osso com a perda do dente acontecem geralmente nos primeiros 3 meses após a exodontia porém, em até 6 meses o tamanho do rebordo residual é reduzido mais rapidamente<sup>39</sup> e em 12 meses menos significativamente<sup>40</sup>, embora seja menos intensa após 12 meses, continua progressivamente ao longo da vida do indivíduo; à medida que

o tempo da extração até a colocação do implante aumenta haverá maior perda de volume ósseo a um nível que inviabilize a reabilitação posterior com implantes sem a necessidade de cirurgias maiores<sup>41</sup>.

A perda clínica em altura é maior do que em largura sendo a parede vestibular da maxila mais reabsorvida do que na mandíbula<sup>30, 37</sup>. Estudos apontam que essa perda óssea pode chegar a 50% da medida vestibulo-lingual no primeiro ano após a perda dentária<sup>42</sup>.

Se as condições dimensionais ósseas existentes não são favoráveis para um resultado final esperado a cavidade oral deverá ser modificada como por exemplo com os enxertos ósseos com o objetivo de tornar compatíveis o suporte dos implantes e o planejamento protético a longo prazo<sup>43</sup>.

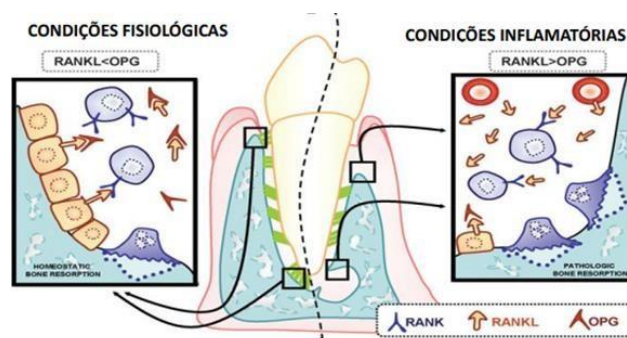


Figura 13: Sistema RANK RANKL OPG<sup>44</sup>.

O equilíbrio de RANKL/OPG (Figura 13) é um fator crucial para regulação da reabsorção óssea alveolar. A diferenciação e ativação osteoclástica são conduzidas pela interação de RANKL com seu ligante, Rank. A OPG é um inibidor solúvel de RANKL que inibi a ligação RANK/RANKL. Em condições homeostáticas (Figura 13, lado esquerdo), acredita-se que os níveis de RANKL e OPG estejam em equilíbrio, de modo que a osteoclastogênese e a reabsorção óssea sejam limitadas. Com um estímulo inflamatório, a razão RANK/Rankl aumenta nos tecidos periodontais e levam a estimulação da atividade osteoclástica e reabsorção óssea patológica. Precursores de osteoclastos e osteoclastos ativos são representados por células azuis mononucleadas e multinucleadas respectivamente<sup>Erro! Indicador não definido.</sup>

### 1.13. Reabilitação com implantes

A quantidade e densidade do osso disponível no sítio desdentado, são comprovadamente fatores determinantes primários para a previsão do sucesso individual frente à reabilitação com implantes. A altura do osso disponível em um sítio edêntulo é a dimensão mais importante ao se considerar um implante pois, afeta tanto o comprimento do implante quanto à altura da coroa que afetam os fatores de carga e a estética. O aumento ósseo é mais viável em largura do que em altura, mesmo quando a largura for inadequada para instalação do implante, o enxerto ósseo pode ser usado pra criar os requisitos de um osso ideal na reabilitação dental. Uma vez que a altura adequada tiver disponível a largura é o próximo critério mais significativo que afeta a sobrevivência do implante. A largura será mais facilmente restabelecida com enxertos ósseos do que a altura óssea<sup>43</sup>. A Figura 14 demonstra um implante instalado nas condições adequadas.

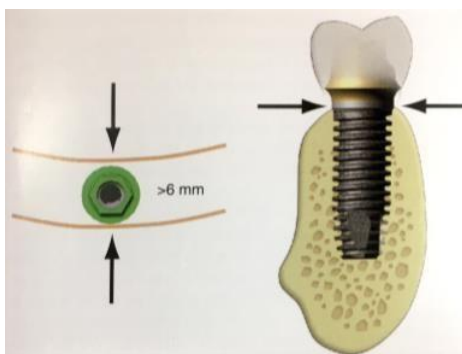


Figura 14: Desenho demonstrando o implante corretamente instalado e totalmente circundado em tecido ósseo para estabilidade primária e sucesso da reabilitação <sup>45</sup>.

A estrutura interna do osso é descrita em termos de qualidade e quantidade, as quais refletem um número de propriedades biomecânicas, tais como resistência e módulo de elasticidade. A arquitetura externa e interna do osso controla virtualmente cada faceta da prática da implantodontia. A densidade do osso disponível em um sítio desdentado é um fator determinante no plano de tratamento, projeto do implante, abordagem cirúrgica, tempo de cicatrização e

carga inicial progressiva sobre o osso durante a reconstrução protética para alcançar índices de sucesso na restauração da oclusão do paciente<sup>46, 47</sup>.

A qualidade do osso neoformado após enxertia é importante para suportar a carga mastigatória e dissipação destas no tecido ósseo quando da reabilitação com implantes da região afetada. Estudos apontam que as perdas de implantes estão relacionadas à vascularização, densidade e reabsorção do tecido ósseo obtido após as reconstruções. Isso porque, a qualidade do tecido ósseo obtido pode interferir na estabilidade primária e processo de osseointegração<sup>48</sup>.

O aumento da densidade óssea, a estabilidade primária de implantes também aumenta; e essa estabilidade primária tem relevância clínica por ser determinante para a longevidade da reabilitação com implantes. Na odontologia, foi assumido que a qualidade do osso é equivalente a densidade mineral óssea<sup>10</sup>. Estabilidade primária diz respeito à ausência de mobilidade no leito ósseo após a colocação do implante<sup>49,50</sup> e o implante estável e bem integrado é o desejado para a restauração da oclusão do paciente.

A estabilidade primária do implante parece ser influenciada principalmente por fatores relacionados aos ossos, a saber, a densidade óssea da parte esponjosa do local da osteotomia e a espessura da placa cortical<sup>31</sup>. **Erro! Indicador não definido.**<sup>43, 51, 52</sup>.

A apreciação da densidade óssea e sua relação com a implantodontia existem há mais de 25 anos. A densidade é classificada em três categorias<sup>53</sup>:

- Estrutura óssea Classe I: esse tipo ideal de osso consiste em trabéculas uniformemente espaçadas com pequenos espaços esponjosos.
- Estrutura óssea Classe II: o osso possui espaços esponjosos um pouco maiores e com menos uniformidade do padrão ósseo.
- Estrutura óssea Classe III: Existem grandes espaços preenchidos por medula entre o trabeculado ósseo.

O osso Classe III resulta em perda de adaptação do implante; o osso Classe II era satisfatório para os implantes; e o osso Classe I foi o mais apropriado para suportar próteses implanto-suportadas<sup>53</sup>.

Já a qualidade óssea é classificada de acordo com as quatro regiões dos maxilares: mandíbula anterior, maxilar anterior, posterior da mandíbula, maxila posterior, correlacionadas com as quatro qualidades de osso estabelecidas, elucidado na Figura 15.

- Qualidade 1: Quase toda mandíbula é composta de osso compacto homogêneo.
- Qualidade 2: Uma camada espessa de osso compacto rodeia um núcleo de osso trabecular denso
- Qualidade 3: Uma fina camada de osso cortical rodeia um núcleo de osso trabecular denso
- Qualidade 4: Uma fina camada de osso cortical rodeia um núcleo de baixa densidade óssea trabecular<sup>54</sup>.



Figura 15: Classificação da qualidade óssea. <sup>54</sup>

A Microtomografia (Micro CT) e a Tomografia de coerência óptica são formas de avaliação da densidade e volume ósseo.

O Tomógrafo por coerência óptica OCT-CALLISTO, software ThorImage OCT versão- 4. 2, 4. 0, permite o imageamento óptico de alta resolução axial e não destrutiva, fornecendo imagens transversais de estruturas, sejam elas biológicas ou não. Esta técnica não requer contato com a amostra em análise, não utiliza radiação ionizante e é não invasiva, o que possibilita a sua aplicação in vivo e em tempo real. O equipamento possibilita identificar detalhes de pequenas dimensões e em áreas diminutas, característicos de sistemas biológicos, tais como pele, biofilmes e diversos tecidos duros e moles, assim

como permite o imageamento de diversos materiais espalhadores. Estas características se devem graças ao comprimento de onda de excitação (Domínio spectral: 930 nm, o qual tem menor penetração no tecido biológico do que os excitados na faixa de 800 nm), 1. 2 kHz, resolução lateral de 8  $\mu\text{m}$ , resolução axial < 7, 0  $\mu\text{m}$ , profundidade máxima de imageamento de 1, 6 mm, e Probe para imagens 3D.

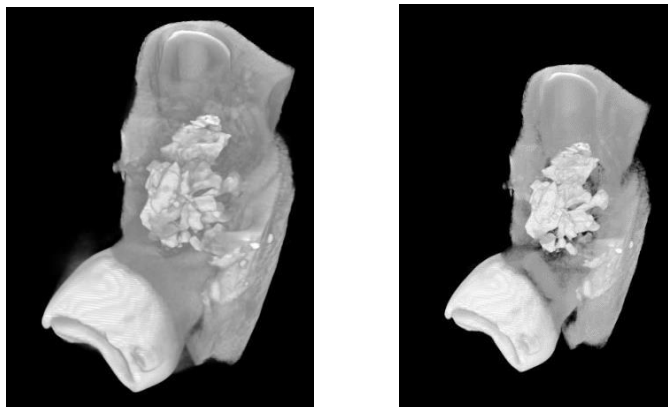
Possui também o modo “Speckle Variance”, o que permite que sejam analisados sinais provenientes de espalhamento tipo Speckle, muito comuns em tecidos biológicos e materiais rugosos. O software permite a reconstrução tridimensional dos cortes obtidos<sup>55</sup>.

Os equipamentos de OCT possuem uma fonte de luz emitida na região do infravermelho próximo (NIR, do inglês Near-Infrared), possibilitando penetrações em tecidos biológicos de 1 a 3 mm e resoluções de 1 a 15  $\mu\text{m}$ , variando de acordo com a instrumentação do equipamento e com o tecido a ser avaliado<sup>56, 57</sup>.

O equipamento de Microtomografia Computadorizada (Micro CT) *in vivo* Skyscan 1272 de alta resolução podendo detectar objetos de o, 35  $\mu\text{m}$ , é utilizado para diversos materiais como biomateriais, algas calcárias, fósseis, répteis, anfíbios, aves pequenas, dentes, pequenos ossos *ex vivo* e *in vivo* e animais de pequeno porte (ratos e camundongos) com monitoração fisiológica integrada<sup>58</sup>.

Consiste em adquirir imagens de raios-X em diferentes ângulos ao redor de um objeto e matematicamente converter este conjunto de imagens em seções que representam uma imagem tridimensional. **Erro! Indicador não definido.** como d estaca-se na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**





*Figura 16: Fotomicrografias: Imagem 3D do Micro CT demonstrando o biomaterial dentro da cavidade alveolar. Fonte: O autor.*

É uma técnica não destrutiva que reconstrói e modela interiores de amostras na escala micrométrica e obtém informações sobre sua geometria tridimensional e propriedades do material, vide Figura 25 na qual observa-se o biomaterial no interior do alvéolo em imagem 3D. O conceito básico desse processo de imagem provou que um objeto tridimensional pode ser reconstruído a partir de projeções bidimensionais<sup>59</sup>.

### **Enxerto Ósseo**

O enxerto ósseo é adicionado ao alvéolo imediatamente após a remoção do dente como vê-se na Figura 17 e pode ser usado em conjunto com membranas absorvíveis ou não absorvíveis que agirão como barreiras mecânicas para a preservação do material enxertado. Os enxertos são capazes de promoverem a formação óssea além de fornecerem suporte mecânico e prevenir o colapso das paredes ósseas retardando a reabsorção do rebordo alveolar servindo como mantenedores de espaço<sup>30, 32, 33, 60, 61</sup>. Estes enxertos devem permitir o início da osteogênese e serem indutores e osteocondutores<sup>32, 62</sup>. Podem ser autógenos, alógenos, xenógenos e sintéticos ou aloplásticos<sup>35</sup>.



*Figura 17: Enxerto ósseo com partículas de osso autógeno obtido do mento***Erro! Indicador não definido..**

As partículas do osso enxertado serão cercadas por tecido ósseo lamelar e medular porém, não são ativamente reabsorvidas sendo a remodelação deste biomaterial lenta preservando as dimensões do alvéolo<sup>33, 34, 63</sup>. O material uma vez enxertado se ligará tanto ao osso alveolar como aos tecidos moles; essa ligação ocorre por fixação bioativa envolvendo a ligação de fibras de colágeno na matriz policristalina da superfície do enxerto<sup>40</sup>; esse íntimo contato pode induzir células mesenquimais primitivas a se diferenciarem em osteoblastos. Essas células osteogênicas migram para o enxerto promovendo a osteointegração do enxerto ao alvéolo<sup>64</sup>.

A membrana de colágeno absorvível associada ao enxerto agirá como barreira física realizando a osteopromoção excluindo a invaginação de tecido conjuntivo gengival para o interior do enxerto ali presente, e atrairá as células osteoprogenitoras para o local<sup>35, 65</sup>.

O êxito da aplicação de um material no organismo, depende essencialmente de dois fatores: - a sua biofuncionalidade a qual está diretamente relacionada com a capacidade do biomaterial desempenhar uma determinada função (ou parte desta) do organismo, - a sua biocompatibilidade que se baseia na análise das reações ocorridas na superfície do implante, não só quando da sua implantação, mas também ao longo do tempo, quando este sofre um processo de degradação e desgaste<sup>66</sup>.

Assim, em termos de resposta biológica, após implantação de um biomaterial ocorre a formação de um hematoma, com uma resposta de tipo inflamatória com presença de água e glicoproteínas, que revestem e aderem ao implante. Por quimiotactismo, numerosas células são recrutadas para o local, nomeadamente neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos (reação de corpo estranho).

Estas últimas além da sua atividade fagocítica, estimulam a ação dos linfócitos, fibroblastos, osteoclastos e células polimorfonucleares. Seguidamente, inicia-se a angiogênese, com a migração e proliferação de células endoteliais que formarão uma rede de capilares que constituirá o suporte vascular da região<sup>67</sup>. Por fim, devido à ação de citocinas (IL-1 e IL-2) e de diversos fatores de crescimento (TGF- $\beta$ , PDGF, IGF, BMP's) irá ocorrer um processo de diferenciação das células mesenquimatosas pluripotenciais com a formação de matriz óssea e de osso imaturo. A maturação e remodelação que encerram este processo, salientam a semelhança que existe com a fisiologia da formação do calo ósseo, subsequente a uma fratura<sup>68</sup>.

Os determinantes para realização do enxerto ósseo são fatores locais que afetam o prognóstico do procedimento e incluem: ausência de infecção, fechamento de tecido mole, manutenção do espaço, imobilização do enxerto, vascularização do osso, tempo de cicatrização, topografia e tamanho do defeito ósseo entre outros. Além dos determinantes necessários para realizar um enxerto ósseo previsível, existem materiais necessários para aumentar o local. Os materiais de enxerto ósseo e seus mecanismos de ação não são os mesmos. Os materiais usados na implantodontia para auxiliar o enxerto ósseo incluem: (1) Colágeno, (2) DFDB (enxerto alógeno humano desmineralizado congelado e seco), (3) Enxerto alógeno humano congelado e seco (FDB), (4) Osso Xenógeno e (5) Osso autógeno<sup>29</sup>, como demonstrado na tabela abaixo

Tabela 3: Materiais de enxerto ósseo.

<b>Materiais de Enxerto Ósseo</b>
<b>Colágeno</b>
<b>Osso autógeno (osteogênese)</b>
<b>Enxertos alógenos DFDB, FDB (osteoidução)</b>
<b>Enxertos xenógenos (osteocondução)</b>

**Fonte:** Adaptado de Misch CE, 2008<sup>45</sup>.

O osso autógeno é o único material de enxerto que forma osso a partir de células transplantadas do osso esponjoso. E, portanto, o único material de enxerto disponível com propriedades osteogênicas que refere-se ao crescimento de osso a partir de células viáveis transferidas para dentro do enxerto<sup>43</sup>.

O osso Desmineralizado Congelado e seco (promove a osteoidução). A osteoidução envolve nova formação de osso a partir de células progenitoras derivadas de células mesenquimais primitivas influenciadas por um ou mais agentes indutores que provém da matriz óssea<sup>69, 70</sup>.

Quando um material osteoindutor é colocado na região subcutânea na ausência de osso ou dentro do músculo, ele pode induzir formação de osso no sítio ectópico. Os materiais osteoindutores mais comumente usados na implantodontia são os autógenos e alógenos. O osso alógeno é um tecido ósseo transplantado a partir da mesma espécie receptora, mas de genótipo diferente. A principal vantagem dos alógenos é que eles eliminam a necessidade de região doadora. Além da disponibilidade ilimitada permite seu uso em grandes quantidades. Os enxertos alógenos mais comuns usados em implantodontia são os DFDBs (enxertos alógenos humano desmineralizados, congelados e secos) e FDBs (enxertos alógenos humano congelados e secos), que envolvem processos diferentes e específicos.

O FDB age principalmente através de um processo osteocondutor, pois as proteínas indutoras são liberadas lentamente após a reabsorção de mineral e

frequentemente são encontradas em quantidade mínima. Na DFDB haverá ainda a etapa de desmineralização do osso triturado o que expõe mais prontamente as BMPs. Portanto, o FDB é osteocondutor e o DFDB não é osteocondutor, pois não possui nenhum mineral, mas acredita-se que seja mais osteoindutor. Há grande variabilidade de resultados discutidos na literatura para o enxerto alógeno devido à fabricação e formulação do produto que assegurem a qualidade e as propriedades osteoindutoras e resultados dos estudos que evidenciam a capacidade osteoindutora do DFDB foram realizados com materiais enriquecidos com rhBMP-2 (Proteína Morfogenética Óssea Recombinante Humana), e seus resultados podem não ser reprodutíveis na prática clínica<sup>71, 72, 73, 74</sup>.

A osteocondução, que é caracterizada pelo crescimento ósseo por reabsorção ou aposição a partir do osso circundante, tem sido chamada de substituição. Portanto, esse processo deve ocorrer na presença de osso ou células mesenquimais diferenciadas. Os materiais osteocondutores não formam osso quando colocados em tecido subcutâneo, músculos ou tecido fibroso. Pelo contrário, o material permanece relativamente inalterado ou reabsorve. Os materiais osteocondutores são biocompatíveis, e o osso e tecido mole podem crescer adjacentes a eles por aposição sem evidência de reação tóxica. Os materiais de enxerto ósseo osteocondutores mais usados em implantodontia são os alógenos, materiais aloplásticos e xenógenos<sup>75</sup>. E podem ser caracterizados em não reabsorvíveis ou reabsorvíveis, densos ou porosos, cristalinos ou materiais amorfos<sup>76</sup>.

Materiais aloplásticos são produtos exclusivamente sintéticos e biocompatíveis desenvolvidos para cobrir uma ampla variedade de indicações. Eles existem em grande variedade de texturas, tamanhos de partículas e formas. Podem ser separados em cerâmicos, polímeros e compósitos.

Os usados com mais frequência são os cerâmicos, que são caracterizados como bioinertes (p. ex, óxido de alumínio e óxido de titânio) ou bioativos (p. ex, fosfato de cálcio). As cerâmicas bioinertes exibem adesão direta ao osso do hospedeiro (a nível microscópico) e são mecanicamente mantidas em contato

com o osso. A cicatrização do osso ao redor de um implante osseointegrado bioinerte é um processo de osteocondução. Que segue as forças típicas de remodelação na interface osso-implante<sup>43</sup>.

As cerâmicas bioativas são a maior família de materiais aloplásticos usados para enxerto ósseo e incluem produtos de fosfato de cálcio, tais como uma HA sintética (hidroxiapatita sintética) e matriz óssea inorgânica bovina, fosfatos tricálcicos e carbonatos de cálcio. Os materiais de fosfato de cálcio exibem uma completa falta de toxicidade. A capacidade deles de agirem como substrato para o crescimento ósseo os torna um material popular com propriedades osteocondutoras, mas eles não são osteogênicos ou osteoindutores<sup>63</sup>. Esses materiais geralmente, são feitos de HA, fosfato betatricálcio ( $\beta$ TCP), porções inorgânicas de osso xenógeno ou várias combinações<sup>77</sup>.

Os materiais xenógenos são fabricados a partir da porção inorgânica do osso de outros animais e também são osteocondutores<sup>78</sup>. Por esse motivo, necessitam de um tratamento antigênico, de deslipidização e desproteínização, que lhe reduz concomitantemente as suas capacidades osteoindutoras<sup>79</sup>. O enxerto de osso xenógeno é descrito como um bom banco de material, desde que ele seja completamente desproteínado e colocado sobre osso esponjoso ou usado com medula óssea vermelha autógena<sup>80</sup>; e pode, também, ser usado para aumentar tecido mole. Os criadores dos enxertos xenógenos acreditam que o osso inorgânico do animal se assemelha ao osso mineral humano natural<sup>43</sup>.

Segundo alguns pesquisadores, além de fornecer uma estrutura de suporte, este material também promove uma alta liberação de cálcio<sup>81</sup> e fósforo, essenciais para a neoformação óssea. Devido ao enorme sucesso na sua utilização, esse biomaterial tem sido atualmente considerado o “padrão ouro” entre os materiais ósseo- substitutos.

A porosidade do material tem efeito principal no tempo de reabsorção. As partículas densas e cristalinas de HA podem durar o tempo de uma vida

quando são grandes em tamanho e volume e sob condições de pH estável em um sistema lento de renovação. As formas amorfas de HA podem reabsorver em vários meses quando em pequenos tamanhos e volumes e em uma região de rápida velocidade de renovação. Os materiais microporosos são intermediários nos tempos de reabsorção, mas podem precisar de mais de 1 ano quando em grandes volumes, tais como em seio maxilar. Materiais parcialmente ou lentamente reabsorvíveis podem ser misturados com materiais facilmente reabsorvíveis. A previsibilidade de resultados clínicos com a utilização de substitutos ósseos alógenos, xenógenos e aloplásticos são opções válidas para o processo de reparo tecidual, devido a baixa taxa de reabsorção em volume e o sítio cirúrgico unitário<sup>82</sup>.

Os biomateriais na forma de *scaffolds*, possuem características ideais para serem usados nas estratégias regenerativas ósseas pois servem como um guia para o crescimento de tecido ósseo e permitem a proliferação de vasos sanguíneos e de nutrientes para as células que estão dentro do sítio cirúrgico<sup>83</sup>.

Desse modo, os materiais que reabsorvem lentamente mantêm o espaço enquanto o corpo invade o material facilmente reabsorvível. A presença de uma parede cortical espessa no enxerto pode agir de maneira similar à membrana na regeneração óssea guiada e prevenir a infiltração de epitélio e tecido conjuntivo para dentro da região enxertada<sup>43</sup>. A Figura 18 representa um alvéolo com e sem enxerto ósseo após extração.

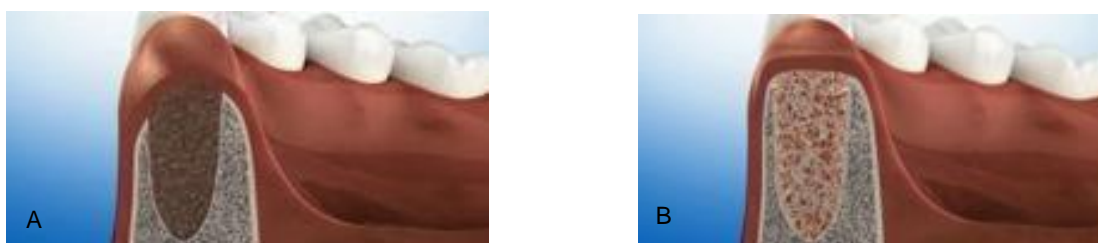


Figura 18: Representação do alvéolo pós extração com e sem enxerto ósseo. (A) Alvéolo pós exodontia sem enxerto ósseo e (B) Alvéolo pós exodontia preenchido por material scaffold<sup>84</sup>.

A remodelação e neoformação óssea promoverá a substituição do osso enxertado por osso nativo, e determinará a qualidade da densidade óssea

local<sup>32</sup>. A reabsorção desses materiais ocorre principalmente por meio de dois mecanismos: dissolução e mediação celular. A reabsorção por dissolução de um material ocorre em consequência do pH do meio circundante<sup>78</sup>. Na reabsorção mediada por células, as células ao redor do material do enxerto reabsorvem o material por fagocitose seguida da degradação intracelular<sup>85</sup>.

A consideração mais importante para o sucesso de um enxerto é “esperar mais tempo”, ou seja, o tempo de cicatrização deve ser respeitado afim de que haja a devida incorporação do enxerto ao osso nativo<sup>43</sup>.

#### **1.14. Fotobiomodulação**

Estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados a fim de incorporar métodos e técnicas que possam intervir positivamente aumentando a integração e remodelamento de diversos substitutos ósseos utilizados para a preservação alveolar e melhoria da qualidade óssea local. A associação da fotobiomodulação utilizando Laseres de baixa potência e LED são métodos que vem se mostrando eficazes; os estudos demonstram que irão acelerar e estimular a neoformação óssea e tecidual melhorando todo o processo de reparação do sítio cirúrgico<sup>86, 87, 88</sup>.

Estudos recentes mostram que a fototerapia LED induz um processo de reparo mais rápido, com presença de osso neoformado de boa qualidade. Características que são notadas em vários estudos nos quais foi utilizada a fototerapia laser com parâmetros semelhantes. Sendo bastante provável que os efeitos benéficos do LED e Laser sejam similares no que se refere ao mecanismo envolvido, com a absorção da luz pelo citocromo-C-oxidase presente na membrana mitocondrial. Apesar do crescimento das aplicações bem-sucedidas da fototerapia LED em diversas áreas, seu uso no reparo ósseo e associado a enxerto de biomateriais precisa ser mais estudado<sup>89, 90, 91</sup>.

Estudos de Karu *et al.*<sup>92</sup> registraram resultados clínicos satisfatórios sob o aspecto das diferentes fontes de luz, sugerindo efeitos benéficos advindos da terapia com LED em diversos tipos de lesões cutâneas.



Os diodos emissores de luz (LED- Light Emitting Diode) são a fonte de luz mais comum. Eles são usados em uma infinidade de aplicações. Os LEDs são baseados em junções pn, geralmente feitas de semicondutores III-V, que emitem luz quando uma corrente direta é injetada. LEDs são os mais comuns dispositivo semicondutor composto<sup>93</sup>. Esse tipo de emissão é diferente dos lasers, que produzem emissão estimulada e amplificada de radiação. Inicialmente, se atribuía os efeitos do laser à coerência, mas foi mostrado que fontes não coerentes como o LED também alcançavam bons resultados<sup>94</sup>. Nesse contexto, o LED surge como uma excelente opção em virtude do seu potencial de ação<sup>95, 96</sup>.

A fotobiomodulação agirá na síntese da matriz óssea, aumentando a vascularização e potencializando a proliferação e diferenciação dos fibroblastos e osteoblastos que serão fotobiomodulados progredindo mais rapidamente para a formação da matriz óssea celular auxiliando como fator indutivo. Haverá adesão dos osteoblastos e a migração dos vasos para a superfície do enxerto ativando a microcirculação local e a produção de novos capilares sanguíneos. Possui efeitos analgésicos e anti-inflamatórios além do estímulo ao crescimento e regeneração celular<sup>92, 97</sup>.

Quando a luz interage com as células do tecido funções celulares são estimuladas como ativação de mastócito, estimulação de linfócitos, aumento da produção de ATP (adenosina trifosfato) mitocondrial e proliferação de vários tipos de células<sup>36, 98</sup>, acelera a proliferação e diferenciação dos fibroblastos e osteoblastos<sup>86</sup>.

Os efeitos observados podem ser resultados positivos da irradiação do Laser/LED na membrana celular e mitocôndria. Efeitos positivos sobre a síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico)<sup>99</sup> e RNA (ácido ribonucleico) e na síntese de colágeno e em seus precursores também foram relatados e no nível de prostaglandina e nos grânulos citoplasmáticos fagocitários como bem como na neovascularização e proliferação celular<sup>98</sup>. As células mesenquimais não diferenciadas são biomoduladas positivamente para osteoblastos e mais rapidamente diferenciadas para osteócitos<sup>99</sup>.

A fotobiomodulação melhora a produção da matriz óssea devido à melhoria da vascularização e efeitos anti-inflamatórios<sup>32, 100, 101, 102</sup>. Resultando num aumento tanto da liberação de mediadores e microvascularização, que seria subsequentemente acelerar a cicatrização óssea<sup>32, 101</sup>. Estudos mostram que o laser promove melhora na osteogênese e reparo ósseo<sup>103, 104</sup> nos estágios iniciais da cicatrização e atuará como fator indutivo<sup>70</sup>, é responsável por aumentar a atividade em células de osso (reabsorção e formação) em torno do local de reparação, sem alterar a estrutura do osso<sup>105</sup>. Foi sugerido que a PGE2 (prostaglandina E2) ativa cicatrização de feridas e aumento do nível de PGE2<sup>75</sup>. Porém mais estudos são necessários sobre os efeitos do laser em fatores de crescimento, BMPs (proteínas morfogenéticas óssea), prostaglandinas e genes de formação óssea<sup>106</sup>.

A fotobiomodulação para a reparação do osso, demonstrou eficácia na modulação tanto da resposta local e sistêmica aprimorando a troca celular iônica e mitocondrial, a mineralização do osso, formação de óxido nítrico, circulação linfática, a proliferação de osteoblastos, os efeitos sobre a expressão do gene de osteoblastos, a inibição de osteoclastos (previne a reabsorção mineral óssea) e pelo enxerto de osso em materiais sintéticos. Reduz substancialmente o tempo de consolidação da fratura, bem como melhora a qualidade/quantidade de formação de reparo ósseo<sup>107</sup>.

O tecido ósseo absorverá a radiação emitida pelas luzes (Laser/LED) provocando efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos. Como consequência efeitos como o estímulo à microcirculação e ao trofismo celular, além de efeitos terapêuticos, os quais incluem efeito analgésico, anti-inflamatório, antiedematoso e estimulante do trofismo dos tecidos. Vários estudos na literatura demonstram efeitos positivos no reparo ósseo<sup>108</sup>, aceleram a cicatrização<sup>109</sup>, a angiogênese, estimulação do osso recém-formado, fibrovascularização e angiogênese<sup>110</sup>.

Apesar de todos estudos envolvendo fotobiomodulação, as modificações moleculares e metabólicas globais produzidas que determinam a estimulação do metabolismo das células ósseas ainda não estão completamente elucidadas. <sup>111</sup>

Sugere-se que a resposta fotobiológica é devido a absorção de um comprimento de onda específico por algum fotorreceptor molecular que participa no metabolismo das reações celulares, que não necessariamente podem ser diretamente ligados às respostas à luz em si. Depois de absorção de um comprimento de onda específico e a excitação, processos moleculares primários, que ocorrem nos receptores moleculares, podem levar à resposta fotobiológica<sup>98</sup>.

O efeito da fotobiomodulação com Laseres e LED terão maior ação em fases iniciais, quando elevada proliferação celular ocorre. Porém, ainda é incerto se a estimulação óssea por luz Laser e LED possuem um efeito geral ou se a estimulação isolada de osteoblastos é possível. Nos estágios finais terão papel importante na manutenção do preenchimento ósseo devido a maior deposição de matriz óssea que incorpora hidroxiapatita de cálcio caracterizando a maturação do osso<sup>86</sup>.

A maior parte dos estudos que envolvem fotobiomodulação foram e são realizados com Lasers; apesar de efeitos benéficos e promissores da fotobiomodulação com LED na aceleração e melhora da qualidade do osso neoformado terem sido demonstrados preliminarmente, é necessário mais estudos realizados com esse tipo de luz para estabelecer um protocolo seguro em sua utilização no reparo, regeneração e neoformação óssea em exodontia e enxertos ósseos com biomaterial<sup>111</sup>. O estudo realizado teve o objetivo de avaliar o impacto da fotobiomodulação na qualidade óssea de alvéolo dental de ratos Wistar pós exodontia associada ou não à biomaterial *scaffold*.

#### *Justificativa*

Dado o estado da arte acima aludido e as presentes limitações tecnológicas dos tratamentos atuais, faz-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas alternativas e/ou adjuvantes para auxiliar o reparo tecidual após a exodontia com ou sem a presença de biomaterial *scaffold*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o impacto da fotobiomodulação utilizando LED no processo de remodelação óssea na presença ou não de biomaterial *scaffold* enxertado em alvéolos dentais de ratos *Wistar*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar o modelo experimental (enxertia de biomaterial *scaffold* em ratos *Wistar*)
- Examinar o impacto da fotobiomodulação na presença de osteoblastos;
- Avaliar o impacto da fotobiomodulação na formação fibras colágenas;
- Estudar o efeito da fotobiomodulação na presença de osteoclastos;
- Avaliar a ação da fotobiomodulação na presença de osteócitos;
- Medir densidade óssea na presença ou não de fotobiomodulação e biomaterial
- Mensurar o volume ósseo após a fotobiomodulação na presença ou não de biomaterial

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Ética

O presente estudo foi realizado de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional para o Controle de Experimentação Animal (CONCEA), bem como com as normas do Conselho Canadense de cuidados com animais (1993) e do Congresso Nacional Brasileiro (1995). Aprovado ao Comitê de Ética em animais da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), com o número do Ceua: 4123300818. Anexo 1.

#### 3.2. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pois apresentam estruturas da área dentogengival e a topografia dos alvéolos dentais, são similares aos encontrados em humanos<sup>112</sup>; o que facilita reproduzir uma enxertia com biomaterial *scaffold* após exodontia e analisar os tratamentos propostos; além do custo acessível e facilidade na reprodução desses animais<sup>113, 114</sup> tem mostrado bons resultados no tratamento de enxertia óssea com biomateriais<sup>106</sup>.

Os animais foram obtidos do Biotério da UNINOVE e acondicionados no mesmo local, em caixas plásticas apropriadas, sob temperatura mínima de 22°C e máxima de 25°C, com luminosidade controlada em ciclos de 12 horas, alternando entre claro e escuro, com ventilação controlada artificialmente e umidade relativa de 50-60%. Foi utilizada ração para ratos *Wistar* (NUVILAB®) e água *ad libitum*. Foram incluídos 48 ratos *Wistar* machos, adultos, com peso aproximado de 300g e considerados saudáveis. Os animais foram manipulados três vezes antes do início do experimento, para ambientação e pesagem.

#### 3.3. Delineamento experimental

Os ratos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais com 12 animais por grupo, conforme Tabela 4:

Tabela 4: Delineamento Experimental.

<b>Basal</b>	Sem intervenções e tratamentos
<b>Controle</b>	Exodontia
<b>LED</b>	Exodontia e tratamento com LED ( $\lambda=850\text{nm}$ )
<b>Biomaterial</b>	Exodontia+Biomaterial
<b>Bioamterial+LED</b>	Exodontia+Biomaterial+Tratamento com LED ( $\lambda=850\text{nm}$ )

A cirurgia foi realizada no 1º dia. O tratamento com LED foi realizado a partir do 1º dia e seguiu por 15 dias de 48/48 horas. A eutanásia foi realizada no 15º e 30º dias. O fluxograma exposto na Figura 19, mostra o delineamento do estudo.

## Fluxograma

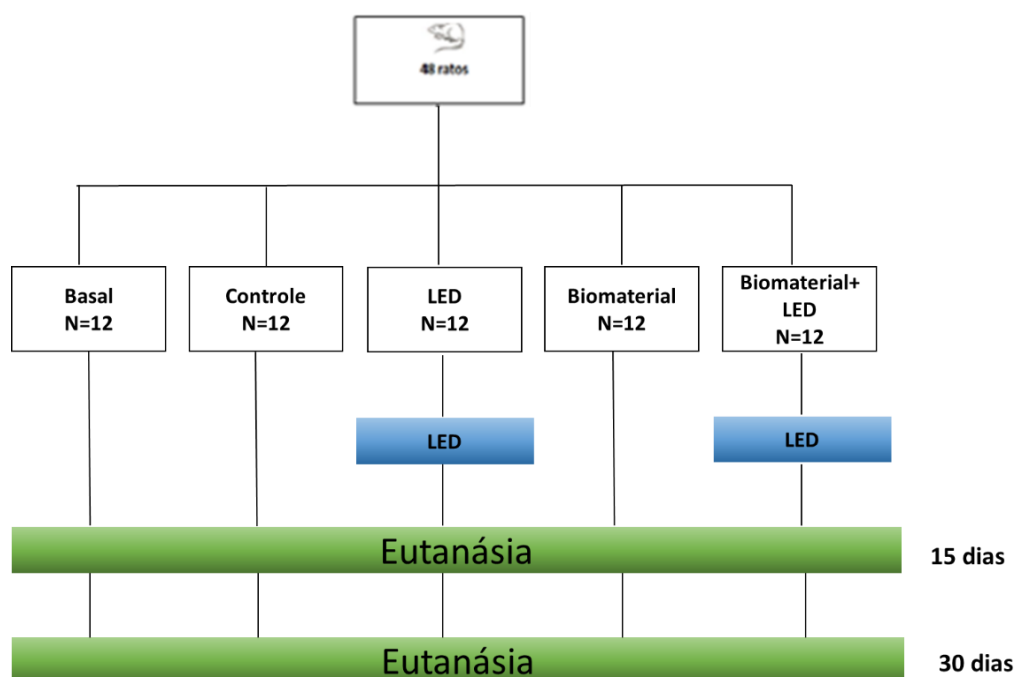


Figura 19: Fluxograma dos grupos. Fonte: O autor.

### 3.4. Técnica cirúrgica para exodontia e enxertia óssea

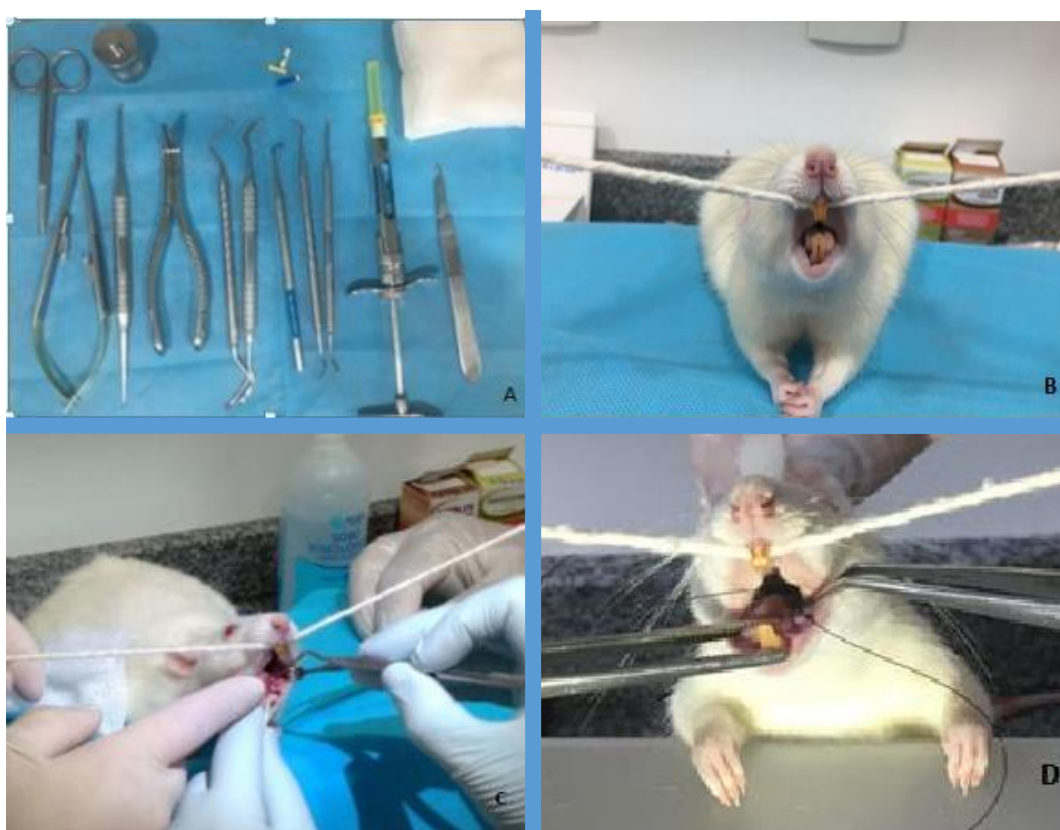
Para a cirurgia seguiu-se metodologia similar à utilizada em estudo de Ramos AGG, 2016 que pesquisou sobre os efeitos do laser de baixa intensidade na fotobiomodulação óssea, após exodontia de molares em ratos espontaneamente hipertensos; no estudo foram utilizados 24 ratos espontaneamente hipertensos SHR do gênero feminino, onde foi realizado a exodontia dos molares direito e esquerdo na mandíbula, e no alvéolo lado direito foi aplicado a laserterapia, segundo os seguintes parâmetros:  $\lambda$ : 808 nm, P= 100 mW<sup>115</sup>, os animais foram submetidos à anestesia nos seguintes parâmetros:

- Preparo do anestésico: Ketamina 800 $\mu$ l, Xilazina 500 $\mu$ l.
- Administração: 80 mg/Kg de Ketamina e 10 mg/Kg de Xilazina, Ultrafine Seringa de Insulina® 1, 0ml, agulha 12. 7x0. 33 – 29G, via intraperitoneal, região abdominal inferior.

Para a técnica cirúrgica de extração do molar foram utilizados materiais adequados e adaptados para a pesquisa. Dois suportes metálicos serviram de pilares para a linha de algodão que foi utilizada para envolver os incisivos centrais superiores do rato, a mandíbula foi apoiada em um suporte plano, a língua foi deslocada a direita ou esquerda com gaze e pela mão do auxiliar operatório. A sindesmotomia gengival foi realizada com instrumental do tipo sindesmótomo modificado (desgastado com disco de carborundum e lixas) para se adequar ao tamanho da região operatória. A exodontia foi executada realizando primeiramente, a luxação do elemento dentário com instrumental do tipo Hollembach e periótomo modificados (por desgaste com disco de carborundum e lixas) e após a exodontia propriamente dita, com fórceps pediátrico número 5 para raízes residuais, conforme **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

Após a exodontia, nos grupos que necessitaram de enxertia com biomaterial, foi utilizado Straumann® Cerabone® 0, 5-1, 0 mm, 1x 0, 5 cc(Origem: Osso

bovino esponjoso e composição: Fosfato de cálcio (hidroxiapatita 100% pura, fase mineral), adicionado imediatamente ao alvéolo com cureta apropriada e levemente acomodado ao alvéolo com instrumental do tipo espátula de inserção pediátrica e realizado fechamento tecidual do alvéolo com fio agulhado oftalmológico 6-0 de nylon. Os animais dos grupos selecionados para execução de tratamento com LED ( $\lambda = 850$  nm), foram submetidos à primeira irradiação ao final da realização da técnica cirúrgica, e demais irradiações, de 48/48 h por 15 dias.



*Figura 20: Técnica cirúrgica: (A) Materiais preparados para início da técnica (B) posicionamento do animal (C) Exodontia (D) Fechamento dos alvéolos com biomaterial por aproximação gengival com sutura. Fonte: o Autor.*

Após a anestesia os animais foram colocados em colchonete térmico até o retorno anestésico para evitar hipotermia e ministradas as seguintes medicações pós-operatórias, Tramadol 5 mg/kg subcutâneo, 8/8 h 3 dias e Dipirona Sódica 50 mg/kg subcutâneo, 8/8 h 3 dias.



Os animais foram observados durante os 15 dias e 30 dias que sucederam a cirurgia, quanto alimentação, hidratação, peso, presença de qualquer alteração no sítio cirúrgico. As etapas do procedimento cirúrgico estão demonstradas na Figura 20.

### **3.5. Biomaterial utilizado**

O biomaterial *scaffold* utilizado foi Straumann® Cerabone® 0, 5-1, 0 mm, 1x 0, 5 cc (Origem: Osso bovino esponjoso e composição: Fosfato de cálcio (hidroxiapatita 100% pura, fase mineral, porosidade: 65-80%, tamanho médio dos poros: 600-900 µm). Integra-se previsivelmente na matriz óssea recentemente formada, proporcionando uma base sólida e duradoura para suportar os implantes dentários. Devido as características técnicas necessárias para seu uso como a osteocondutividade (morfologia da superfície rugosa e a alta porosidade são responsáveis pelas propriedades osteocondutoras), estabilidade do volume (os grânulos garantem a estabilidade e integram-se de forma previsível ao osso recém-formado), segurança (processo patenteado de fabricação remove as componentes orgânicos), biocompatibilidade (biocompatibilidade em mais de 650. 000 procedimentos de sucesso de aumento ósseo), hidroflicidade (poros interconectados e a morfologia da superfície rugosa), fácil manuseio e aplicação (partículas absorvem e aderem)<sup>116</sup>.

### **3.6. Fotobiomodulação com LED**

A aplicação do LED foi realizada imediatamente após a cirurgia para a primeira aplicação e seguiu a cada 48 h por 15 dias obedecendo os parâmetros demonstrados na tabela 5:

Tabela 5: Parâmetros dosimétricos empregados com LED.

<b>Comprimento de onda [nm]</b>	<b>850</b>
<b>Modo de funcionamento</b>	<b>Contínuo</b>
<b>Potência [mW]</b>	<b>100</b>
<b>Área do feixe [cm<sup>2</sup>]</b>	<b>2,8</b>
<b>Tempo de exposição [s]</b>	<b>60</b>
<b>Irradiância [W/cm<sup>2</sup>]</b>	<b>35, 7</b>
<b>Exposição radiante [J/cm<sup>2</sup>]</b>	<b>30</b>
<b>Energia radiante [J]</b>	<b>6</b>
<b>Número de pontos irradiados</b>	<b>Único</b>
<b>Locais de aplicação</b>	<b>Face vestibular extra oral</b>
<b>Técnica de aplicação</b>	<b>Contato</b>
<b>Número de sessões e frequência</b>	<b>8 sessões- 48/48 h por 15 dias</b>
<b>Energia total [J]</b>	<b>48</b>

Para realizar o tratamento, não foi utilizada anestesia prévia. Apenas contenção do rato com toalha de algodão pelo auxiliar operatório e o LED aplicado pelo operador elucidado na Figura 21.



Figura 21: Tratamento com LED. Fonte: o Autor.

### **3. 7. Eutanásia dos Animais**

Os animais foram eutanasiados no 15º dia e 30º dia, utilizando overdose de anestésico – Ketamina (Dopalen) e Xilazina (Anasedan) e pela exanguinação por meio da veia cava abdominal, para coleta de sangue (4ml) e exames de fosfatase ácida e alcalina.

- Administração: 3 vezes a dose usual de 80 mg/kg de Ketamina e 10 mg/kg de Xilazina, Seringa de 3 ml, agulha 12. 7x0. 33 – 29G, via intraperitoneal, terço inferior abdominal.

Então foi realizada a exsanguinação por meio da veia cava abdominal, coleta de sangue e centrifugação deste para exames de fosfatase ácida e alcalina, seguida de dissecação e remoção da mandíbula do animal para análise histológica, exame de OCT e Micro CT. O plasma do sangue centrifugado foi mantido a – 80º C e a mandíbula conservada em geladeira e no dia imediato à cirurgia foi realizado o exame de OCT, sendo na sequência desta análise, congeladas à -20º C e a posteriori realizada a análise de Micro CT e análise histológica.

### **3. 8. Análise Fosfatases Ácida e Alcalina- dosagem de marcadores ósseos (ALP, AcP)**

Para realizar a análise das fosfatases ácida e alcalina, foi realizada a retirada de sangue pela veia cava inferior através da exanguinação do rato. Após tricotomia da região e corte com lâmina de bisturi 20 e tesoura na região abdominal do animal, as vísceras são deslocadas para a direita com uma gaze e a veia é encontrada do lado esquerdo. A exanguinação foi feita pela coleta de sangue, recolhido em seringa hipodérmica de 5 ml e agulha descartável de 25x 7 mm. Coletado 4 ml e dispensado no tubo de coleta de sangue vácuo 10 ml. O sangue dos animais foi coletado sem o uso de um anti-coagulante, A amostra foi centrifugada (1500 rpm por 15 minutos) para separação do sobrenadante do soro, inserido num eppendorf e guardado a a -80º C para posterior análise pelo método ELISA. O restante das hemácias foi descartado.

A AcP (*Acid Phosphatase*) foi quantificada utilizando o Kit comercial da marca Labtest®. A reação para detecção da concentração de fosfatase ácida seguiu as recomendações do fabricante, descritas nas seguintes etapas: Primeiramente, o substrato foi reconstituído com 20mL de tampão fornecido pelo fabricante. A seguir, o substrato (50µl) foi acondicionado em cada poço de uma placa de 96 poços, a qual permaneceu em incubação a 37°C durante o período de 2 minutos. Após a incubação, foi adicionado 10µl da amostra em cada poço e a placa foi submetida a outro período de incubação, desta vez por 30 minutos, novamente a 37°C. Em seguida, 200µl do reagente de cor foram adicionados aos poços e a leitura, realizada imediatamente. A absorbância foi registrada por espectrofotômetro modelo: SpectraMaxPlus384® (fabricante: Molecular Devices) em filtro laranja, a 590nm e 37°C, em modalidade *endpoint*. Para os cálculos, foram utilizados os seguintes critérios, sendo a Absorbância Padrão de 0, 1025; Absorbância Controle de 0, 062: Fosfatase Ácida (U/l) = (Absorbância do Teste - 0, 062) x 29, 27 (Fator)

A ALP (*Alkaline Phosphatase*) foi quantificada utilizando o Kit comercial da marca Labtest®. A reação para detecção da concentração de fosfatase alcalina seguiu as recomendações do fabricante, descritas nas seguintes etapas: Primeiramente, substrato (5µl) e solução tampão(50µl) foi acondicionada em cada poço de uma placa de 96 poços, a qual foi incubada a 37°C durante 2 minutos. Após a incubação, foi adicionado 5µl da amostra em cada poço e a placa foi submetida a outro período de incubação de 10 minutos a 37°C. Em seguida, 200µl do reagente de cor foram adicionados aos poços e a leitura realizada imediatamente. A absorbância foi registrada por espectrofotômetro modelo: SpectraMaxPlus384® (fabricante: Molecular Devices) em filtro laranja, a 590nm e 37°C, em modalidade *endpoint*. Para os cálculos, foram utilizados os seguintes critérios, sendo Absorbância Padrão de 0, 2405:

$$\text{Fosfatase alcalina (U/l)} = \text{Absorbância do Teste} \times 176 \text{ (Fator)}$$

### 3. 9. Tomografia de Coerência Óptica (Optical Coherence Tomography-OCT)

As amostras foram removidas após eutanásia e conservadas a  $-20^{\circ}$  C e foram analisadas em até 24 hrs após a remoção. O equipamento pode ser observado na Figura 22.

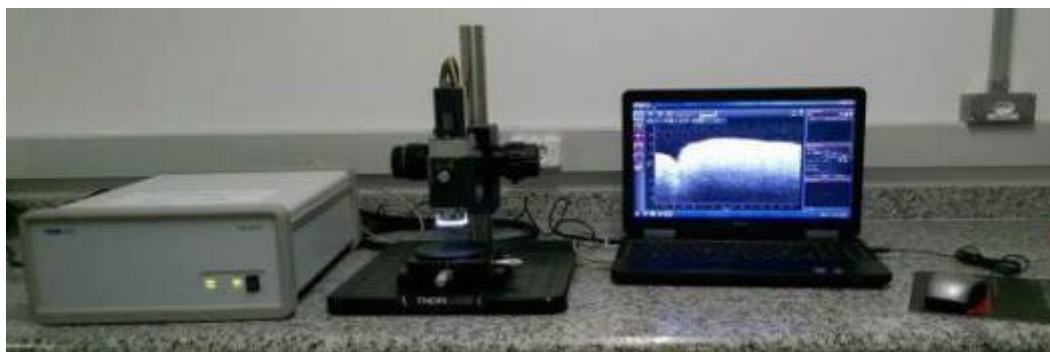


Figura 22: Equipamento de Tomografia de coerência óptica-OCT-CALLISTO, software ThorImage OCT versão- 4. 2, 4. 0, da Universidade Federal do ABC<sup>117</sup>.

Os arquivos “. oct” que obtidos ao avaliar as amostras por OCT foram analisados no software MatLab ®. Como as amostras não eram padronizadas, a primeira etapa da análise consistiu na definição da região de interesse. Para cada imagem foi definida uma região, um retângulo com dimensões proporcionais a 100 colunas e 450 linhas, conforme apresentado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

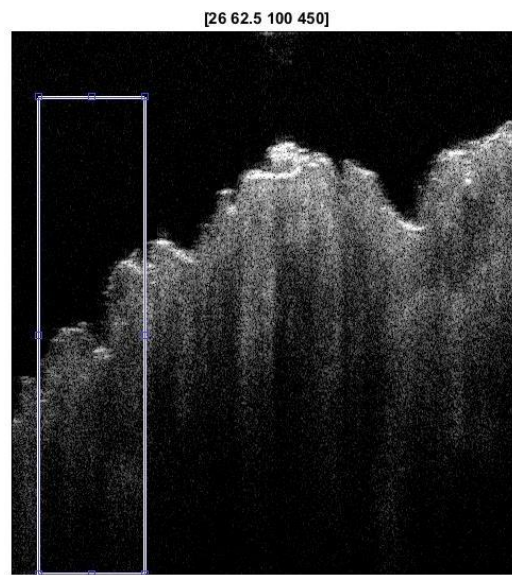


Figura 23: Exemplo de seleção da região de interesse na imagem. Fonte: O autor

Para cada coluna dentro da região de interesse foram feitas duas análises: o cálculo do coeficiente de atenuação e o cálculo da refletância integrada.

#### *Coeficiente de atenuação*

Para o cálculo do coeficiente de atenuação, em cada coluna foi localizado a posição da superfície da amostra, que corresponde ao pixel de maior intensidade. Pixels anteriores a esse são excluídos, bem como os três primeiros pixels a partir da superfície (alta intensidade de reflexão) e os pixels a partir da posição 48, assim garantimos que em todas as colunas serão avaliadas a mesma quantidade de pixel, que corresponde a uma profundidade de 450 em relação à superfície da amostra visto na Figura 24.



Figura 24: Seleção dos pixels de interesse. Fonte: O autor.

Foi feito o gráfico da intensidade dos pixels (eixo y) pela profundidade (eixo x), e foi feito o ajuste de uma função exponencial para a obtenção do coeficiente de atenuação (Figura 25), conforme as expressões:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-2\mu z} \quad (1)$$

$$y = e^{ax} \quad (2)$$

$$\mu = -\frac{a}{2} \quad (3)$$

Para cada imagem, foram obtidos os valores de coeficientes de atenuação de 100 colunas, sendo a média desses valores o valor do coeficiente de atenuação da imagem. O valor de coeficiente de atenuação de um grupo foi obtido pela média dos coeficientes de atenuação das imagens das suas respectivas amostras.

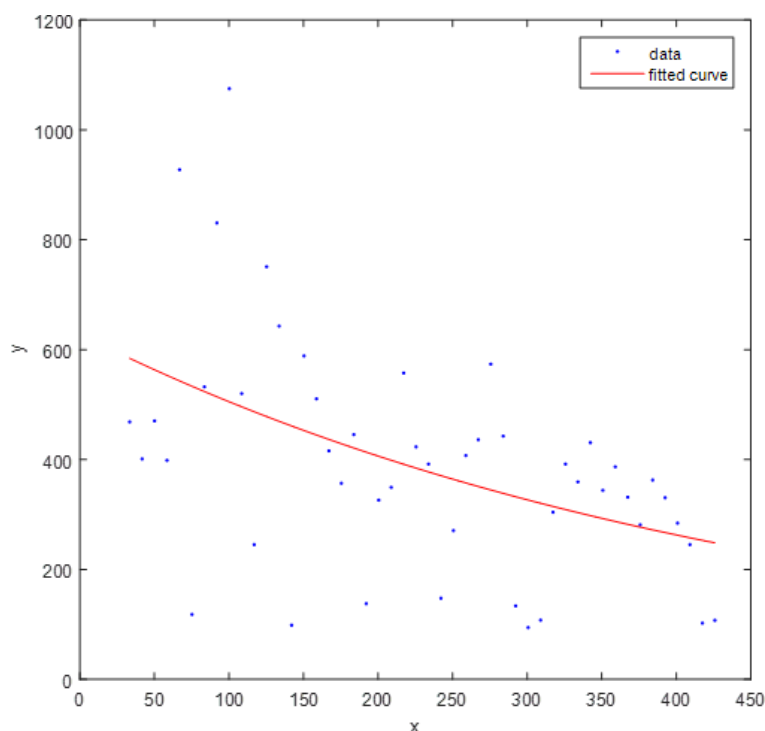


Figura 25: Ajuste de uma função exponencial ao gráfico da intensidade dos pixels pela sua posição do eixo Z (profundidade). Fonte: O autor.

### 3. 10. Refletividade Integrada

Para o cálculo da refletividade integrada, para cada coluna da região de interesse foi feito o gráfico da intensidade dos pixels (eixo y) pela profundidade (eixo x) gráfica, e a integral sob a curva foi calculada para a obtenção a área total. Foram utilizados os mesmos critérios de seleção de pontos que no coeficiente de atenuação (pixel a partir da superfície da amostra, com profundidade de análise fixa) visto na Figura 25.

### 3. 11. Micro Tomografia (Micro CT)

As amostras foram submetidas ao escaneamento em microtomógrafo Skyscan 1272 (Bruker, Bélgica) operando com fonte de raios- X de 20 a 100 KV, disponível no Laboratório de Nanotecnologia no CNPEM (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais- Campinas, SP), para obtenção das projeções tomográficas bidimensionais, demonstrado na Figura 26.





**Figura 26: Especificações do Microtomógrafo utilizado Do Lnanno- Cnpem**  
**ndicador não definido..**

A reconstrução tridimensional foi realizada a partir das projeções obtidas; para tanto foi escolhido para representar a região de interesse (ROI Region Of Interest), uma Figura geométrica de círculo com 3, 12 mm<sup>2</sup> foi posicionada na região central do alvéolo dental ósseo, totalmente inserido na região em que ocorreu a exodontia e/ou enxertia com biomaterial e para posterior seleção de um volume de interesse (VOI, Volume Of Interest).

A binarização para diferenciação do osso do restante de tecidos e para determinação do osso neoformado foi definida na escala de histograma de cinza (150-250) isso consiste na escolha de um limiar para os pixels (threshold) que será aplicado à imagem; todos os pixels que tiverem valores iguais ou maiores ao limiar serão convertidos em um valor determinado saturado, em uma imagem digital com resolução de 8 bits esse valor saturado vale 255. No entanto os pixels com valores inferiores aos do limiar serão convertidos em 0 (zero). O resultado é uma imagem em preto e branco onde a fase branca corresponde ao tecido ósseo e a preta ao restante do tecido (não quantificado), como na Figura 27.



Figura 27: Imagem de binarização de biomaterial utilizado em regeneração óssea<sup>118</sup>.

Definido o VOI e a segmentação das imagens, a análise morfométrica foi realizada utilizando o software CT Analyser (CTAn, Bruker, Bélgica).

### 3. 12. Análise histopatológica

As amostras foram obtidas pela dissecação e remoção da mandíbula do rato. Foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As mandíbulas foram descalcificadas em formaldeído tamponado a 10% por 48 h, após processadas em processador de tecidos e posteriormente incluídos em parafina, foi realizado o corte na espessura de  $3\ \mu\text{m}$  e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e Picrossírius Red (Merck).

A análise fotográfica das lâminas coradas com HE, foi realizada em microscópio de luz *Olympus BX43* e o programa *Cellscens Standar*. e na análise clínica avaliou-se as seguintes alterações estruturais no local do alvéolo: presença/ausência de tecido ósseo, processo inflamatório, organização tecidual, osso neoformado, remodelação com formação ou reabsorção do biomaterial.

O Microscópio de luz polarizada, modelo 61282, Carl Zeiss, Alemanha com objetiva 16x e as imagens foram capturadas pelo mesmo examinador, por câmera fotográfica digital (Sony, Japão) acoplada ao microscópio com zoom de 2,2x, produzindo aumento final de 282 vezes para as imagens das lâminas. Cada imagem foi capturada com luz normal e com luz polarizada, para diferenciação e quantificação posterior da área contendo colágeno.

Seguiu-se avaliação no Software Image J® versão 1. 52t Java, desenvolvido por Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institute of Mental Health é um software processador e analisador de imagens em Java de domínio público. Dessa forma pode ser executado em diversos ambientes operacionais desde que os mesmos possuam uma máquina virtual Java apropriada. O programa também pode ser expandido por meio de vários novos *plugins*.

As lâminas coradas com HE destacaram o percentual da área de matriz óssea e não matriz em relação ao campo. A imagem RGB foi transformada em 16 bit, e em seguida utilizada a inversão de cores pelo *plugin threshold, blackand White*, para obter na imagem somente duas cores. O software torna preta as cores de interesse e branca as demais áreas. Foi determinada a área de matriz extracelular (desmarcar *dark background*). Em *analyse/ measure* terá o percentual de matriz óssea em relação à área total do campo. Sequencialmente, foi determinada a área de não matriz óssea com inversão de cores<sup>119</sup> (marcando *dark background*) e em *analyse/measure* determina se o percentual de não matriz, como na *Figura 28*

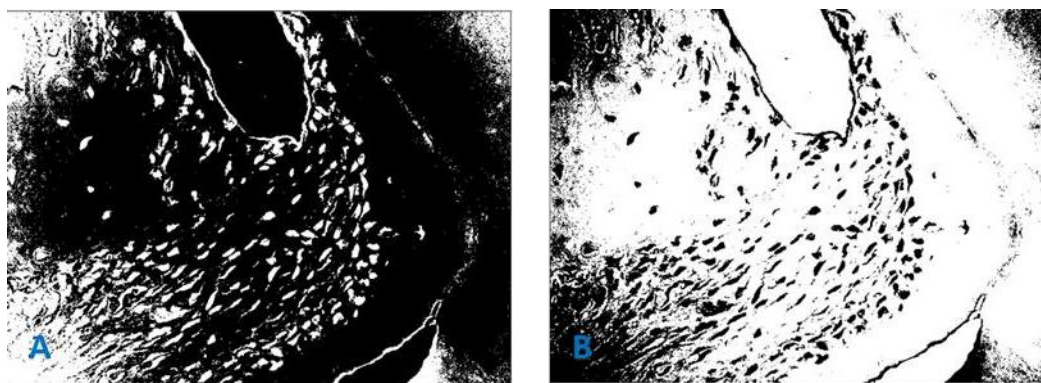


Figura 28: Imagem das lâminas coradas HE avaliadas no software Image J e utilizada a inversão de cores. (A) matriz e (B) não matriz. Fonte: O autor

As avaliações das lâminas coradas com Picrossírius Red, foram realizadas da mesma forma no Software Image J, de duas maneiras:

A primeira análise foi em relação ao percentual da área de colágeno em relação ao campo. A imagem RGB foi transformada em 16 bit, e em seguida

utilizada a inversão de cores pelo *plugin threshold, black and White*, para obter na imagem somente duas cores. O software torna preta as cores de interesse e branca as demais áreas. Foi determinada a área de matriz extracelular (desmarcar *dark background*). Em *analyse/measure* terá o percentual de fibras vermelhas em relação à área da matriz, conforme Figura 29.

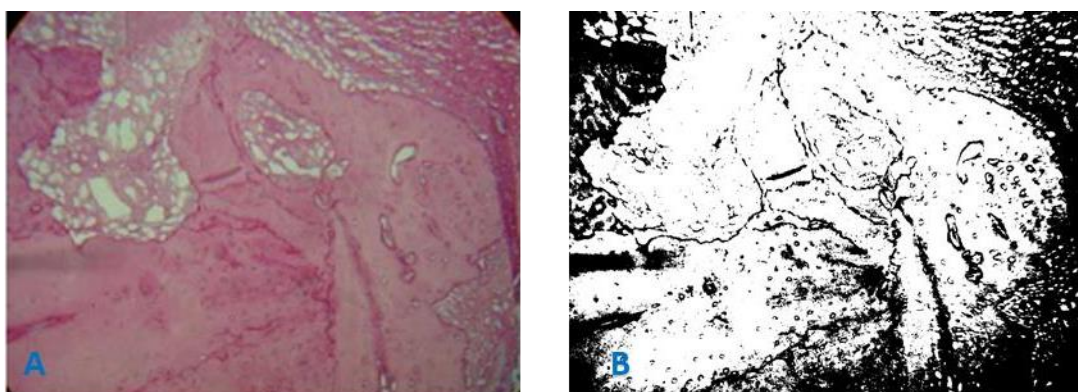


Figura 29: Imagens das lâminas coradas Picrosírius Red avaliada no software Image J. A) Imagem capturada em luz normal, em RGB, B) Imagem 16 bits e *plugin threshold black and white*. Fonte: O autor

A segunda análise foi para determinar a área de colágeno (fibras e fibrilas) na imagem. Para este tipo de análise a lâmina foi corada com *Picrosírius Red*, e a fotografia em microscópio de luz polarizada para que as cores vermelho, vermelho-alaranjado, amarelo e verde possam ser quantificadas. Com a imagem aberta em RGB e a opção *plugins/color fuctions/color deconvolution* e marcada a opção RGB. As janelas com a leitura dos pixels em vermelho, verde e azul aparecem na tela, conforme Figura 30. Foi selecionada a cor a ser mensurada e a opção *threshold* foi selecionada conforme descrito por Ruifrocket *al.* (2001)<sup>120</sup>.

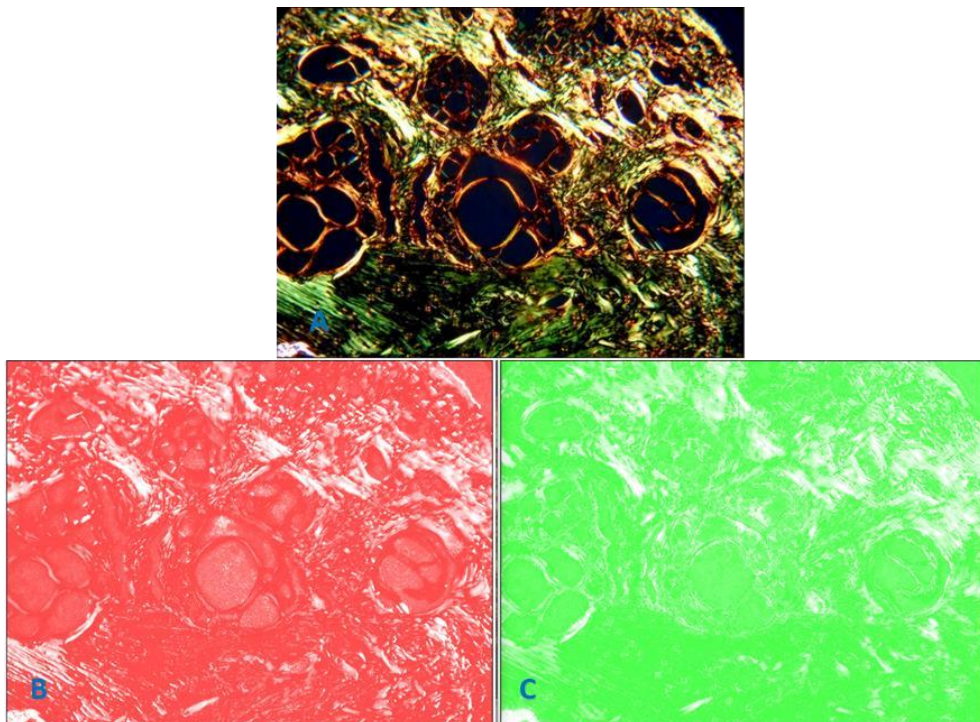


Figura 30: Imagem das lâminas coradas com Picrosírius Red no software Image J. (A): Imagem polarizada em RGB. (B) Imagem com leitura em pixels vermelho. (C) Imagem com leitura em pixels verde. Fonte: O autor

### 3. 13. Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de aderência de Shapiro – Wilk para determinar sua distribuição. Os dados que apresentaram distribuição aproximadamente normal foi realizado uma análise de variância de duas vias. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram utilizados o teste Kruskal-Wallis ANOVA. O teste para múltiplos grupos que indicaram diferença estatisticamente significativa foi utilizado um teste *post-hoc* adequado. O nível de significância foi fixado em  $\alpha = 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise fosfatases ácida e alcalina-dosagem de marcadores ósseos(ALP, AcP).

A Figura 31 mostra o gráfico de médias da fosfatase alcalina para todos os grupos estudados.

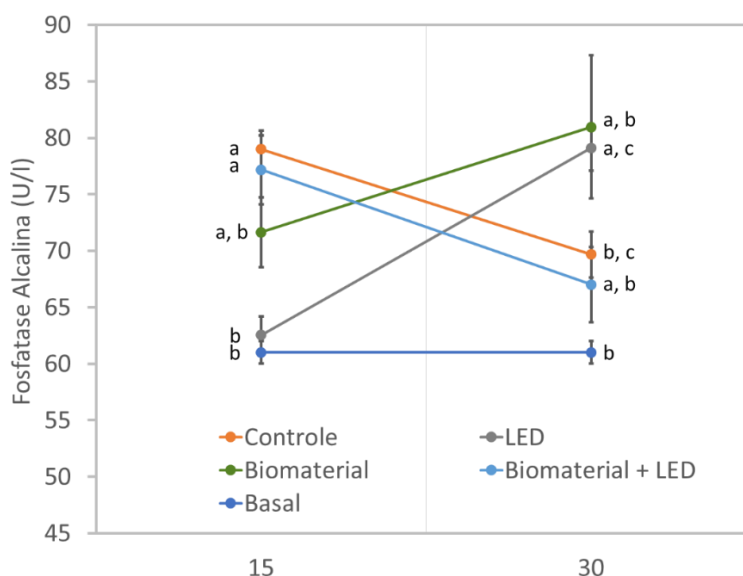


Figura 31: Gráfico de médias de fosfatase alcalina dos grupos estudados. As barras de erro representam os erros padrão. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa. Fonte: O autor.

A análise de variância de duas vias, para a Fosfatase Alcalina, mostrou que há uma correlação entre o tratamento proposto e o tempo de análise ( $p = 0,0002$ , two-way ANOVA), ou seja, o tratamento aplicado impacta de maneira diferente o resultado da fosfatase.

Na análise de 15 dias, os grupos Controle e Biomaterial+LED diferem significativamente do grupo LED ( $p = 0,0086$  e  $p = 0,0379$ , respectivamente. Bonferroni) e do grupo basal ( $p = 0,0001$  e  $p = 0,0179$ , respectivamente. Bonferroni). Na análise de 30 dias, o grupo basal difere significativamente do grupo LED ( $p = 0,0007$ . Bonferroni).

Quando comparamos os períodos de análise (15 e 30 dias), foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos tratamentos controle e LED ( $p = 0,0291$  e  $p = 0,0030$ , respectivamente. Bonferroni)

A Figura 32 mostra o gráfico de médias da fosfatase ácida para todos os grupos estudados.

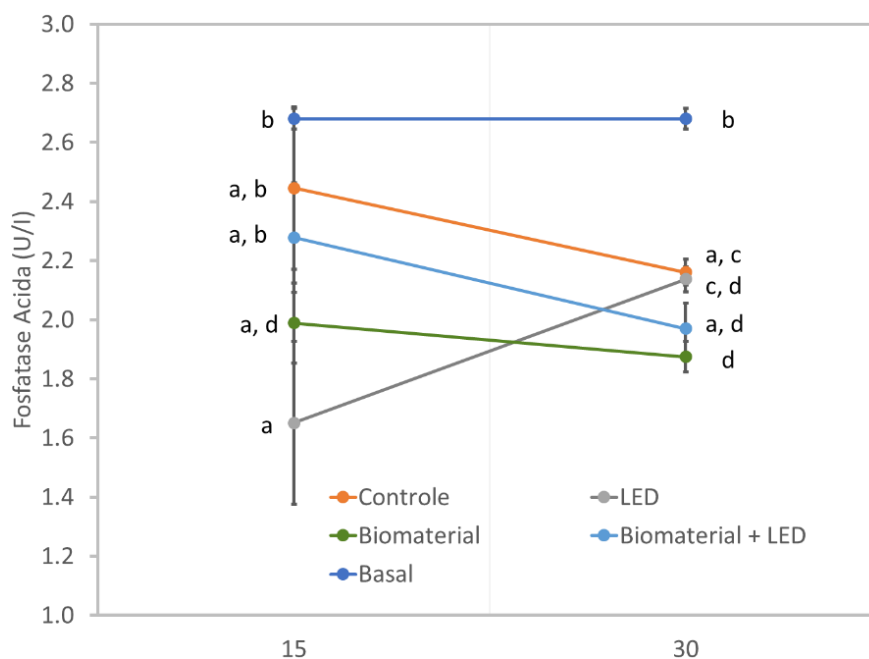


Figura 32: Gráfico de médias de fosfatase ácida dos grupos estudados. As barras de erro representam os erros padrão. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa. Fonte: O autor.

A análise de variância de duas vias, para a fosfatase ácida, mostrou que há uma interação entre o tratamento proposto e o tempo de análise ( $p = 0,0488$ , two-way ANOVA), ou seja, o tratamento aplicado impacta de maneira diferente o resultado da fosfatase. Também foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ( $p = 0.0271$ , two-way ANOVA)

Na análise de 15 dias, os grupos LED e biomaterial diferem significativamente do grupo basal ( $p = 0.0016$  e  $p = 0.0281$ , respectivamente. Bonferroni). Na análise de 30 dias, o grupo controle difere significativamente do grupo Biomaterial ( $p = 0.0175$ . Bonferroni) e todos os grupos diferem do basal ( $p < 0.05$  para todas as análises. Bonferroni)

Quando comparamos os períodos de análise (15 e 30 dias), foi encontrada diferença estatisticamente significativa no tratamento LED ( $p = 0.0356$ . Bonferroni).

#### 4.2. Tomografia de Coerência Óptica (Optical Coherence Tomography- OCT)

A análise clínica pelas imagens obtidas no estudo, mostrou melhora cicatricial nos grupos com LED e melhor organização tecidual superficial, conforme pode ser observado na Figura 33.

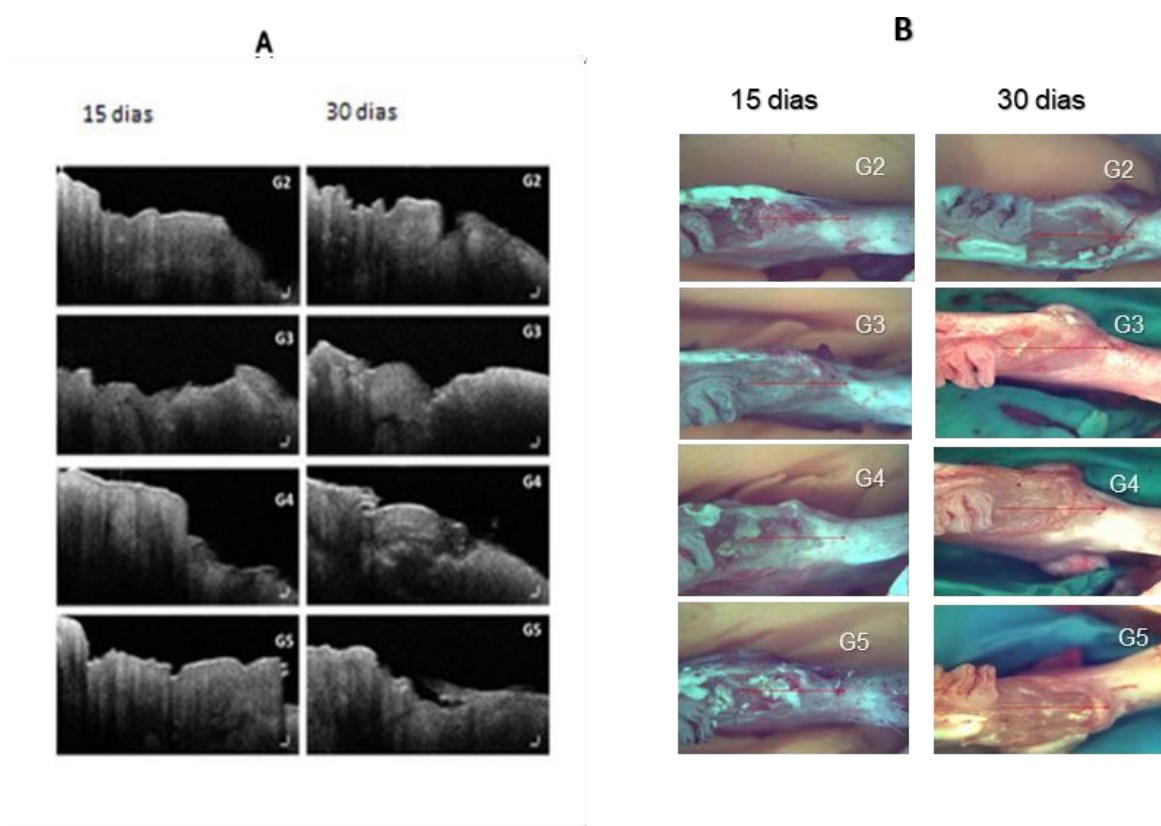


Figura 33: Fotomicrografia de imagens de OCT aos 15 e 30 dias. A) Imagem em pixels dos reflexos de luz do OCT e B) Imagens escaneadas das amostras mostram nos grupos G3 e G5 melhora cicatricial e organização tecidual superficial. Fonte: O autor.

As imagens obtidas pela tomografia de coerência óptica foram analisadas quanto à seu coeficiente de atenuação e reflectividade integrada.

A Figura 34 mostra a reflectividade integrada dos grupos estudados.



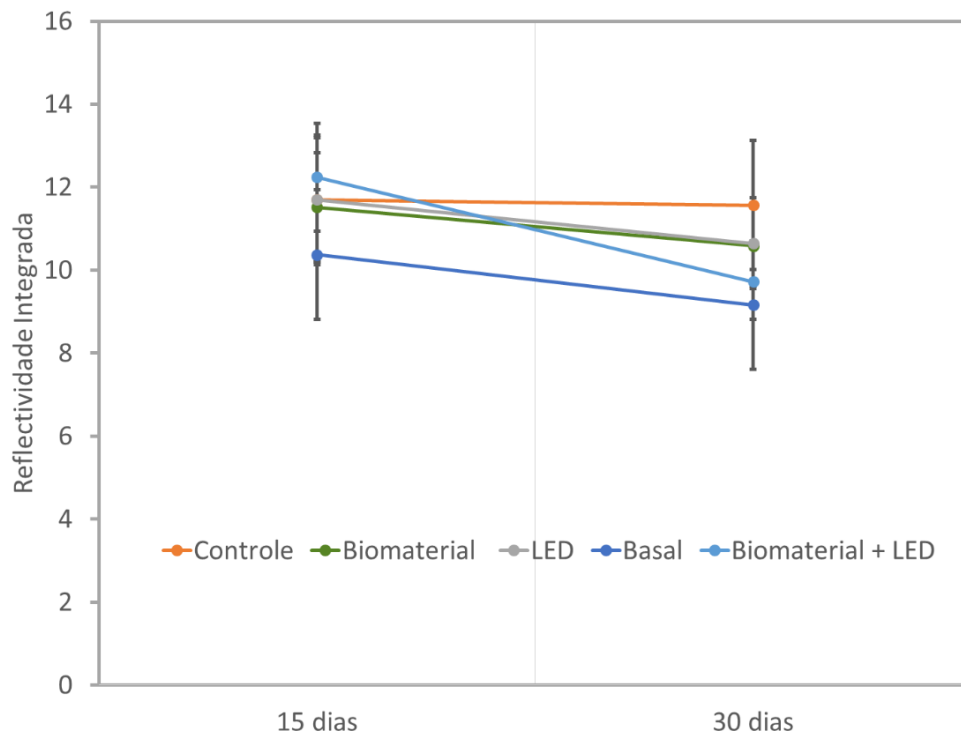


Figura 34: Médias de reflectividade integrada dos grupos estudados. As barras de erro representam os erros padrão. Fonte: O autor.

A análise de variância de duas vias demonstrou ausência de diferença estatisticamente significativa no tempo, nos tratamentos e nas interações para todos os grupos estudados ( $p = 0.1061$ ,  $p = 0.7121$  e  $p = 0.9290$ , respectivamente. Two-way ANOVA), conforme pode ser observado na Figura 34.

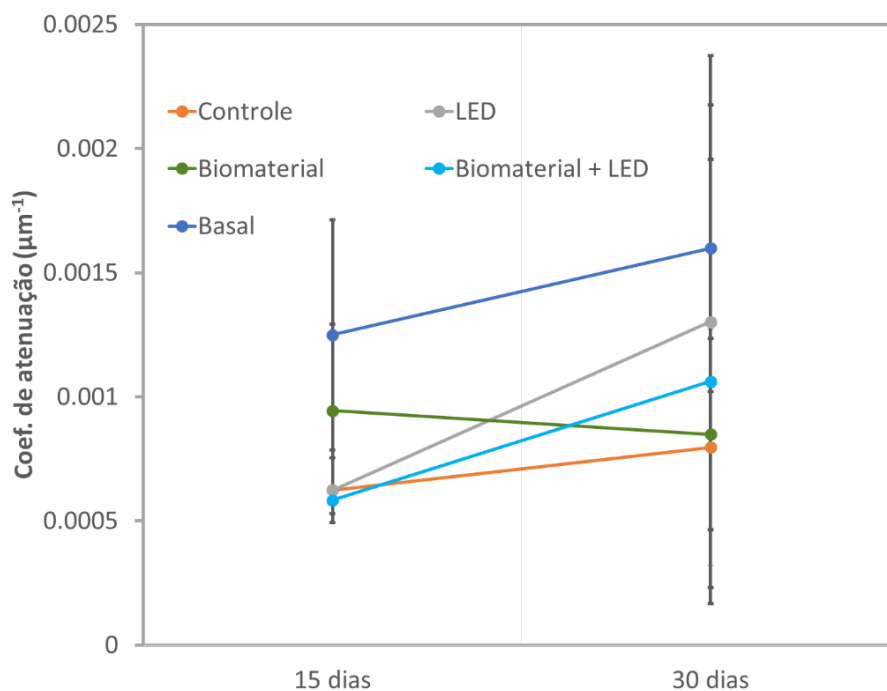


Figura 35: Médias do coeficiente de atenuação dos grupos estudados. As barras de erro representam os erros padrão. Fonte: O autor.

A análise de variância de duas vias demonstrou ausência de diferença estatisticamente significativa no tempo, nos tratamentos e nas interações para todos os grupos estudados ( $p = 0.1982$ ,  $p = 0.6005$  e  $p = 0.8037$ , respectivamente. Two-way ANOVA), visto na Figura 35.

### 4.3. Microtomografia (Micro CT)

A análise de variância de duas vias da densidade óssea obtida demonstra ausência de diferença estatisticamente significativa no tempo e nas interações para todos os grupos estudados ( $p = 0.535$ ,  $p = 1.0000$ , respectivamente. Two-way ANOVA), entretanto há diferença entre os tratamentos propostos ( $p = 0.0001$ , Two-way ANOVA), conforme pode ser observado na Figura 36.

Em 30 dias, o grupo controle difere significativamente dos grupos biomaterial e Biomaterial+LED ( $p < 0.05$ , t-test). O grupo LED também difere significativamente dos grupos biomaterial e Biomaterial+LED ( $p < 0.05$ , t-test). A análise em 15 dias demonstrou ausência de diferença estatística entre os grupos estudados, observado na Figura 36.

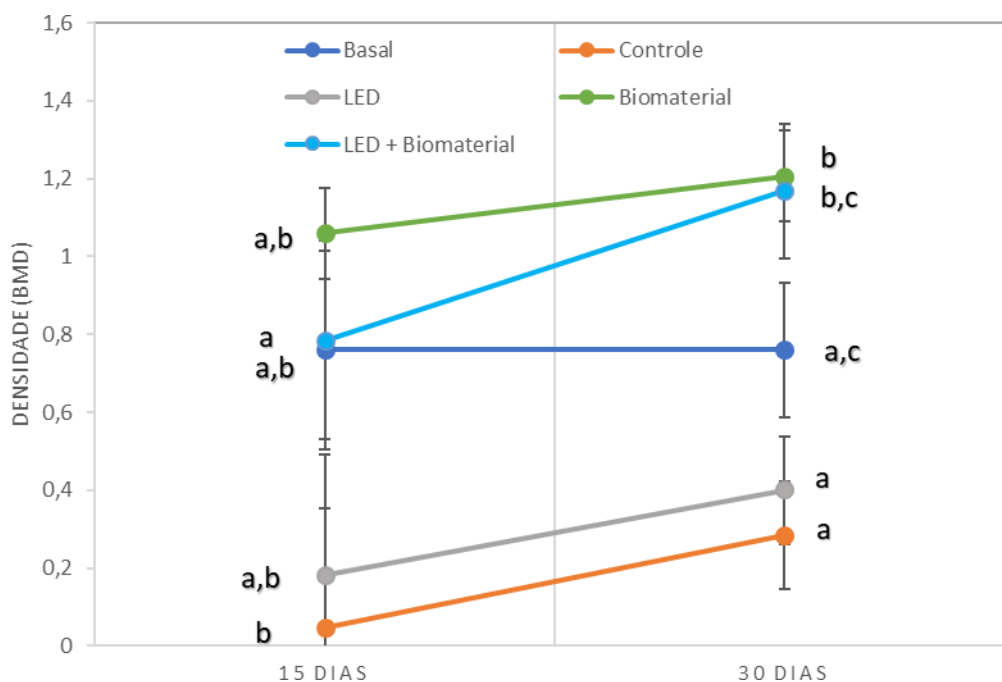


Figura 36: Médias de densidade óssea dos grupos estudados. As barras de erro representam os erros padrão. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa. Fonte: O autor.

A análise de variância de duas vias do volume ósseo obtido demonstra ausência de diferença estatisticamente nas interações para os grupos estudados ( $p = 0,9753$ , respectivamente. Two-way ANOVA), entretanto há diferença entre os tratamentos propostos e nos tempos de estudo ( $p = 0,0001$  e  $p = 0,0026$ , respectivamente. Two-way ANOVA), conforme pode ser observado na Figura 37.

Em 15 dias, o grupo controle difere significativamente do grupo basal, biomaterial e biomaterial + LED ( $p < 0,05$ , t-test). A análise em 30 dias demonstrou que o basal difere significativamente dos grupos controle e LED ( $p < 0,05$ , t-test); o controle difere significativamente dos grupos Biomaterial e Biomaterial + LED ( $p < 0,05$ , t-test) e o grupo LED difere significativamente dos grupos Biomaterial e Biomaterial + LED ( $p < 0,05$ , t-test).

Quando comparamos os períodos de análise (15 e 30 dias), foi encontrada diferença estatisticamente significativa no tratamento Biomaterial + LED ( $p = 0.0362$ . t-test), conforme Figura 37.

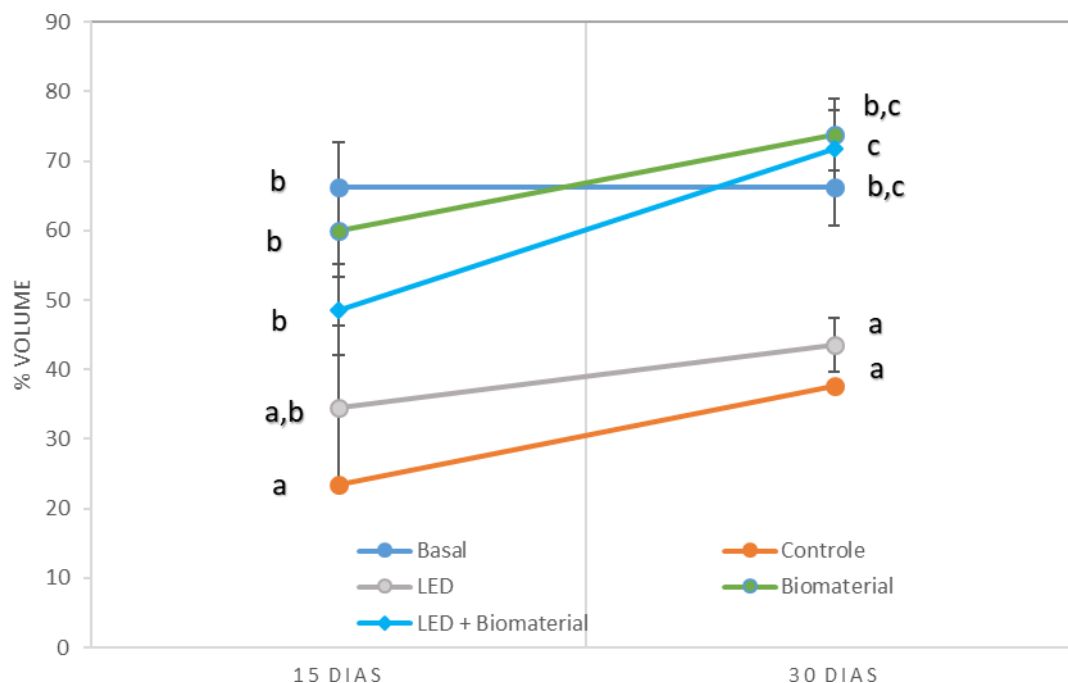


Figura 37: Médias de volume ósseo dos grupos estudados. As barras de erro representam os erros padrão. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa. Fonte: O autor.

#### 4.4. Análise Histopatológica

Na análise clínica histopatológica observa-se grande perda estrutural do osso alveolar após 30 dias no grupo controle, no grupo LED aos 15 dias nota-se intensa atividade de remodelação óssea com presença diversas de áreas de reabsorção e presença em grande número de osteoblastos, e aos 30 dias osso maduro com apresentação de osteócitos e trabeculado ósseo mais organizado.

O grupo Biomaterial apresentou as regiões no interior do biomaterial e no tecido ósseo adjacente bastante desorganizado, com variadas áreas de reabsorção tanto aos 15 como aos 30 dias. Já no grupo Biomaterial+LED o tecido ósseo adjacente mostra-se mais organizado e maduro tanto aos 15 como aos 30 dias, porém no interior do biomaterial não há áreas de reabsorção, como observado na Figura 38.

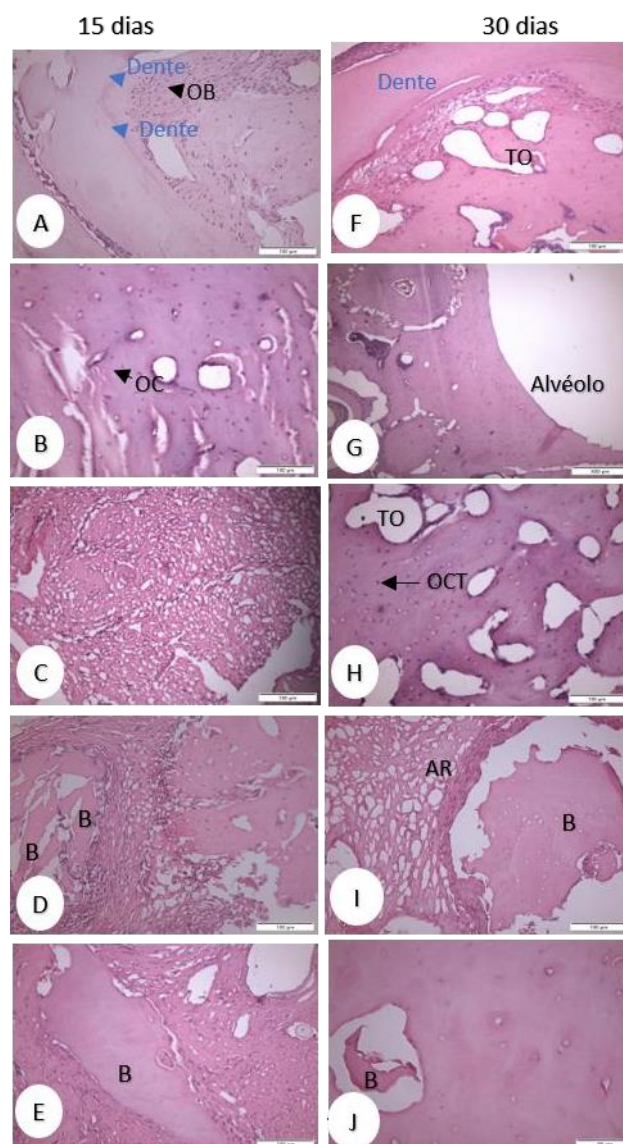


Figura 38: Imagens da análise histopatológica. A) Aspecto do osso com presença de dentes, B) Alvéolo dentário 15 dias após exodontia, presença de osteoclastos (OC), C) Alvéolo dentário 15 dias após exodontia e tratado com LED, intensa atividade de remodelação com diversas áreas de reabsorção e formação óssea, D) Área de reabsorção (AR) ao redor do Biomaterial (B) e no tecido ósseo alveolar, E) Tecido ósseo melhor organizado ao redor do Biomaterial (B) menos áreas de reabsorção (AR) no tecido ósseo alveolar, F) Aspecto do osso com presença de dente aos 30 dias e trabeculado ósseo basal presente, G) Tecido ósseo maduro com presença de diversos osteócitos (OCT) e área do alvéolo (AL) totalmente reabsorvida, H) Osso maduro com presença de osteócitos e trabeculado ósseo presentes, I) Biomaterial (B) com áreas de reabsorção (AR) em seu interior e no tecido alveolar ainda presentes em 30 dias, J) Tecido ósseo alveolar maduro e bem organizado com biomaterial (B) em processo de reabsorção. Fonte: O autor

A análise de variância de duas vias demonstrou ausência de diferença estatisticamente significativa no tempo, nos tratamentos e nas interações para todos os grupos estudados, para matriz óssea. (Two-way ANOVA), vide Figura 39.

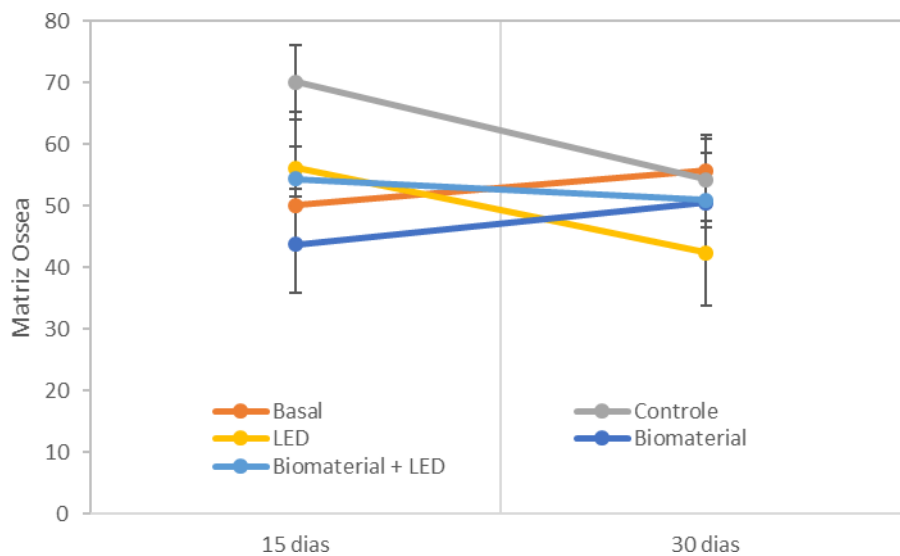


Figura 39: Médias de matriz óssea dos grupos estudados. As barras de erro representam o erro padrão.  
Fonte: O autor

A análise de variância de duas vias demonstrou ausência de diferença estatisticamente significativa no tempo, nos tratamentos e nas interações para todos os grupos estudados, para não matriz óssea (Two-way ANOVA), Figura 40.

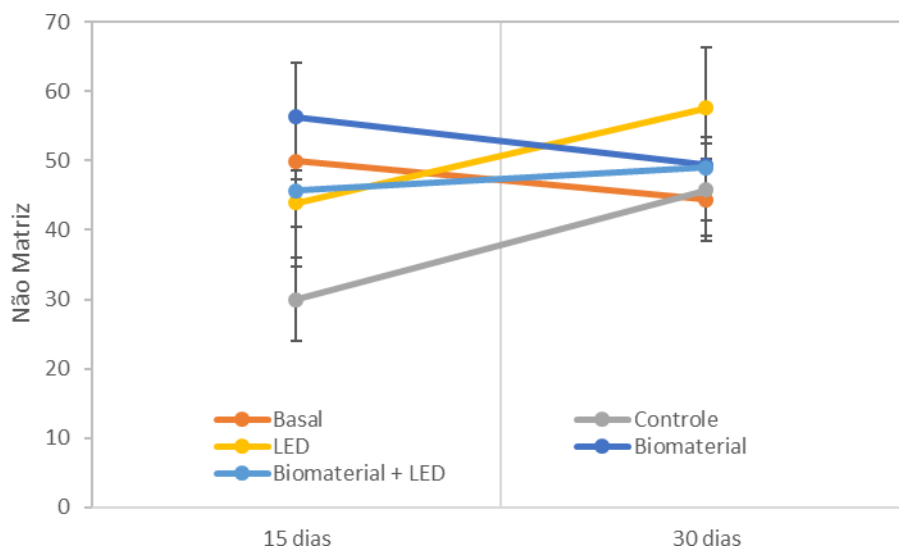


Figura 40: Médias de não matriz óssea dos grupos estudados. As barras de erro representam o erro padrão. Fonte: O autor.

As imagens obtidas no Microscópio de luz polarizado nas lâminas coradas com Picrosírius Red, irão evidenciar as fibras colágenas já presentes no tecido (nos tons de vermelho, laranja e amarelo), e as fibrilas colágenas (nos tons de verde e azul) correspondentes a fibras neoformadas, contidas na matriz óssea, de acordo com a Figura 41.

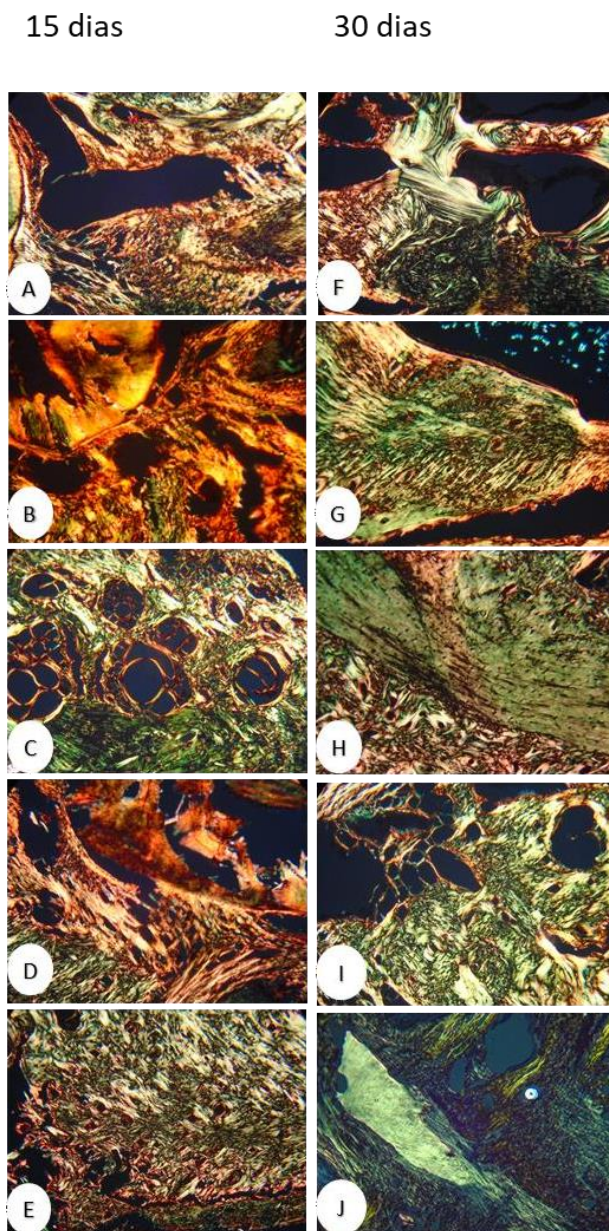


Figura 41: Imagens Picrosírius. As fotomicrografias observa-se grupos de fibras colágenas e fibrilas em tons de vermelho e verde respectivamente A) grupo basal 15 dias, B) grupo controle 15 dias, C) Grupo LED 15 dias, D) grupo Biomaterial 15 dias, E) grupo Biomaterial+LED 15 dias, F) grupo basal 30 dias, G) grupo controle 30 dias, H) Grupo LED 30 dias, I) grupo Biomaterial 30 dias, J) grupo Biomaterial+LED 30 dias. Fonte: O autor

A análise de variância de duas vias demonstrou ausência de diferença estatisticamente significativa no tempo, nos tratamentos e nas interações para todos os grupos estudados para fibra colágena. (Two-way ANOVA), demonstrado na Figura 42.

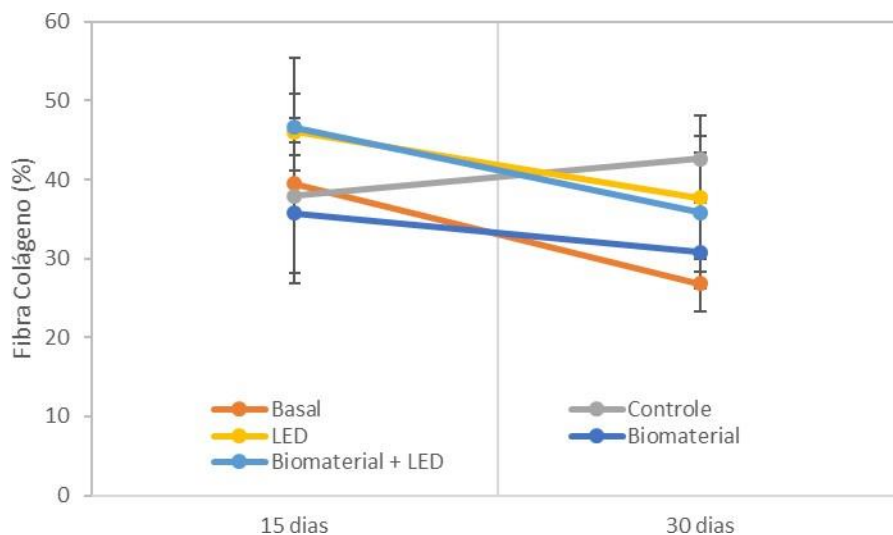


Figura 42: Médias de fibras colágenas entre os grupos estudados. As barras de erro representam o erro padrão. Fonte: O autor

A análise de variância de duas vias demonstrou ausência de diferença estatisticamente significativa no tempo, nos tratamentos e nas interações para todos os grupos estudados para fibrila (Two-way ANOVA), Figura 43.



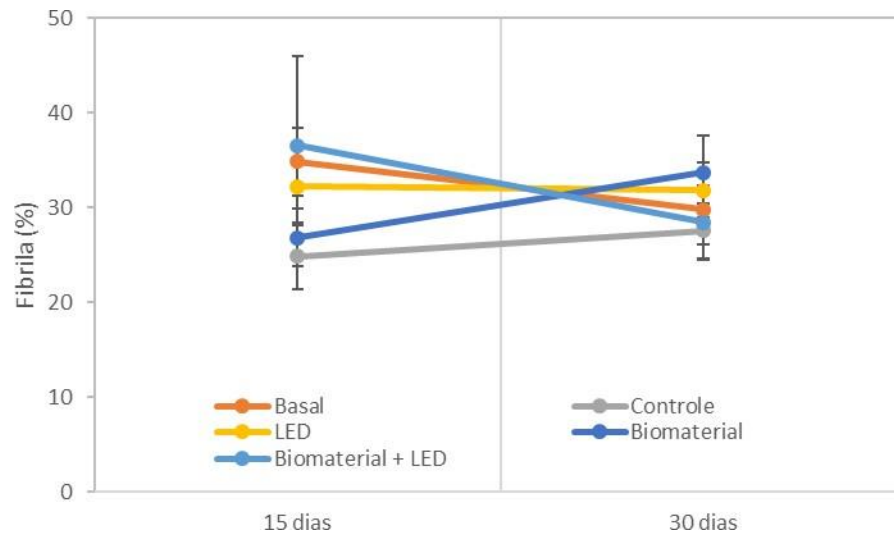


Figura 43: Médias de fibrilas entre os grupos estudados. As barras de erro representam o erro padrão.  
Fonte: O autor

## 5. DISCUSSÃO

A interação da fotobiomodulação em enxertos ósseos é amplamente estudado na odontologia. A maior parte destes estudos avalia a ação do laser de baixa intensidade; os estudos com LEDs tem aumentado, mas ainda necessitam de pesquisas científicas consistentes que demonstrem sua ação no tecido ósseo e em enxertos com biomateriais. Ainda inexistem padrões definidos para obter a melhor fotobioestimulação das células ósseas<sup>Erro! Indicador não definido.</sup>.

Deste modo, este estudo avaliou o impacto da fotobiomodulação na qualidade de alvéolo dental de ratos *Wistar* associado ou não a biomaterial *scaffold*, (Straumann® Cerabone®) adicionado ao alvéolo dental após extração do dente. Para tanto foi utilizado um modelo experimental em ratos *Wistar* cujas pesquisas para remodelação óssea são rotineiras devido ao comportamento de respostas à lesões no tecido ósseo de assemelharem aos humanos<sup>121</sup>. Além de apresentarem rápida cicatrização, baixo custo e estarem presentes em diversas pesquisas em tecido ósseo<sup>99, 110, 121, 122</sup>.

A luz selecionada no estudo foi o LED infravermelho pois diversos estudos com tecido ósseo a utilização da luz utilizam infravermelho por possuir profundidade de penetração superior no tecido ósseo quando comparada à luz vermelha<sup>123</sup> e sendo portanto, mais eficiente para a estimulação da angiogênese<sup>110, 95</sup>.

Algumas pesquisas utilizaram o LED associado ao uso de enxertos com biomateriais, confirmando sua ação na melhora da cicatrização do osso em defeitos ósseos como resultado do aumento da deposição de HA<sup>124, 125</sup>.

Além de provocar mais rápido processo de reparação e melhora a qualidade do osso recentemente formado. Outros resultados de estudos concluem que o avanço na maturação óssea visto nos grupos irradiados está ligado ao aumento na deposição de colágeno. Esse fato está associado a habilidade dos osteoblastos irradiados em secretarem mais HAC<sup>121</sup>.

A ALP na pesquisa realizada, mostrou aos 15 dias melhora na formação óssea para os grupos Controle e Biomaterial+LED, e no grupo LED similar ao grupo basal em que há presença de dente e temos, portanto, uma homeostase do tecido tanto para formação como para reabsorção óssea. Aos 30 dias no grupo

LED ocorreu um aumento significativo da ALP diante dos demais grupos, com isso percebe-se que o LED possibilitou a formação óssea e reparo após cessar sua aplicação. E no grupo Biomaterial+LED, aos 30 dias, nota-se a formação óssea similar ao grupo basal demonstrando que o LED promoveu uma aceleração na cicatrização e maturação óssea neste grupo desta maneira, conclui-se que o LED não melhora significativamente a formação óssea em comparação aos demais grupos, porém indica ação positiva no remodelamento e maturação do osso. O grupo controle diminuiu a ação da ALP aos 30 dias comparado aos 15 dias enquanto o grupo LED aumento significativamente aos 30 a formação óssea comparado aos 15 dias.

Pagim *et al*, 2014 em sua pesquisa comparou os efeitos do diodo emissor de luz (LED) e o laser sobre a proliferação das células MC3T3 pré-osteoblastos e diferenciação. As células foram irradiadas com vermelho, infravermelho e LED (3 e 5 J / cm<sup>2</sup>). Lasers tinha uma densidade de potência de 1 W / cm<sup>2</sup> e tempo de irradiação de 2 e 5 s. Diodo emissor de luz tinha uma densidade de potência de 60 mW / cm<sup>2</sup> e tempo de irradiação de 50 e 83 s e concluiu que não houve aumento na atividade de ALP tanto com Laser com o LED<sup>126</sup>. Já Li e Leu, 2010 investigou os efeitos sobre a proliferação e diferenciação osteogénica de células estaminais mesenquimais (MSCs de rato) usando diodo irradiação de luz vermelha emissores de luz (LED  $\lambda = 630$  nm) aos níveis de irradiância de 5 e 15 mW / cm<sup>2</sup>, e exposições radiantes de 2 e 4 J / cm<sup>2</sup> e observaram melhora em células osteoblásticas avaliadas pela ALP com uso de LED<sup>127</sup> e Pinheiro *et al*, 2017 avaliou as alterações bioquímicas induzidas por Laser ( $\lambda = 780$  nm; 70 mW) ou por irradiação LED ( $\lambda = 850 \pm 10$  nm; 150 mW) durante a mineralização de um defeito ósseo em um modelo animal e constatou que a utilização de fototerapia a Laser melhorou a reparação de defeitos ósseos enxertadas com o biomaterial por aumento da deposição de fosfato de HA, no entanto o LED não foi tão eficiente na promoção da maturidade do osso como o laser nos grupos biomaterial e este fato está provavelmente relacionado com a menor formação de colágeno induzidas por irradiação de luz, que ocorre antes da reabsorção e conversão do biomaterial no osso fosfatado<sup>128</sup>.

A AcP aos 15 dias demonstrou que nos grupos Led e Biomaterial diferiram do grupo basal demonstrando menor reabsorção óssea nesses grupos em relação à condição de homeostase do tecido que ocorre quando há presença do dente e, aos 30 dias o grupo controle diferiu do grupo Biomaterial demonstrando menor reabsorção no grupo Biomaterial e todos diferem do basal com menor atividade osteoclástica. Diante destes resultados não se pode associar o LED à diminuição da atividade reabsortiva do tecido uma vez que grupos sem uso da luz apresentam ação da AcP semelhante à utilização do LED estando todos diminuídos em relação ao grupo basal, demonstrando atividade baixa da AcP e, portanto, da atividade osteoclástica no reparo ósseo.

Este resultado, corrobora com estudo de Zambuzzi *et al*, 2005<sup>129</sup> no qual a atividade da TRAP (Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato) foi extremamente baixa, em seu estudo correlacionou-se o perfil da atividade das fosfatases ácidas com os aspectos histológicos do tecido reacional em resposta à implantação subcutânea de biomaterial de enxerto preparado com matriz óssea desmineralizada bovina e concluiu que a mensuração da atividade de fosfatases é uma ferramenta interessante para a compreensão dos fenômenos envolvidos na resposta celular a implantes de materiais ósseos em tecido conjuntivo e que as suas atividades específicas avaliadas na pesquisa refletem variações celulares nas diferentes fases do reparo tecidual, e a reabsorção do material ocorreu com a presença de baixa atividade TRAP, sugerindo que outras enzimas, como as metaloproteinases de matriz sejam mais relevantes para esse processo. A matriz óssea bovina pesquisada não mostrou potencial de osteoindução, como relatado na literatura, possivelmente pela desmineralização incompleta do material durante a sua produção que preservou fatores inibitórios, como sais de cálcio e alguns radicais antigênicos.

As fosfatases ácidas são hidrolases envolvidas em diversos processos como: reabsorção óssea (TRAP), controle do ciclo celular (Tyr-P) e digestão intracelular (FAL)<sup>2</sup> e a fosfatase alcalina está claramente associada à osteogênese, sendo um importante marcador desse processo. No entanto, em função da complexidade das respostas celulares aos mais diferentes estímulos, muitas vezes é difícil determinar a função exata de certas enzimas nos diferentes processos fisiopatológicos. Assim, recentemente demonstrou-se que

o perfil destas enzimas varia durante o reparo e em função do tipo de material implantado<sup>130</sup>.

No presente estudo, utilizou-se modelo experimental de amostra em alvéolos pós exodontia para estudos de tomografia de coerência óptica. Trabalhos com OCT e tecido ósseo são escassos pois, os ossos estão localizados muito internamente, sob camadas de tecidos moles, implicando em uma maior dificuldade de penetração do feixe de luz. Em geral, os estudos utilizam as imagens obtidas por OCT para medir espessuras e para identificar as estruturas ósseas e estruturas adjacentes<sup>131</sup>

Del-Valle M, 2019 realizou pesquisas em osso alveolar suíno para avaliar osteoporose com OCT; as amostras foram preparadas e submetidas a desafio de descalcificação com solução ácida. A análise de imagens obtidas por tomografia por coerência óptica demonstrou eficácia na distinção entre amostras sadias e amostras com osteoporose simulada<sup>131</sup>.

Em outro estudo, foram utilizados fêmures de rato, e realizadas perfurações para a simulação da lesão e inserindo enxertos ósseos nos orifícios formados. O imageamento por OCT e por Micro-CT foi realizado durante a regeneração do tecido. O estudo concluiu a eficácia da OCT para análise das interfaces entre o osso e o enxerto osteocondutor, avaliando o grau da regeneração óssea. E por ser um método não invasivo que podem ser utilizados no futuro nas técnicas clínicas usuais e atuar como uma ferramenta de alta sensibilidade para a investigação do comportamento dos substitutos ósseos a fim de obter um novo osso<sup>132</sup>.

A OCT é uma técnica de avaliação que visa complementar informações sobre a regeneração do osso, neoformação óssea e comportamento cicatricial deste tecido. Por ser uma técnica ainda pouco estudada em tecido ósseo não há um modelo experimental definido.

A avaliação do estudo realizado não mostrou diferenças estatísticas na avaliação pelo coeficiente de atenuação e nem pela refletividade integrada; uma das possíveis causas recai sobre a irregularidade da superfície alveolar e presença de pequena quantidade de tecido mole aderida no sítio cirúrgico o

que pode ocasionar diferentes espalhamentos e reflexos na incidência da luz, tal fato corrobora com estudos que elucidam que na realização do imageamento por OCT, há ângulos de incidências do feixe no tecido, resultando em diferentes espalhamentos e reflexos, e o aumento do número de interfaces ar-osso ou ar-líquido dos poros, que possuem índices de refração diferentes do osso, resultando em maiores intensidades de reflexões e espalhamentos<sup>133, 134</sup>.

Além disso, a mudança na quantidade de mineral presente no tecido também pode influenciar na interação luz-tecido, uma vez que são alteradas as quantidades de moléculas que interagem com o feixe de luz<sup>132</sup>.

No entanto, na análise clínica realizada pelas imagens escaneadas (Figura 30 B) nota-se que os grupos em que foram utilizados o LED como tratamento (LED e Biomaterial e LED) observa-se uma melhor organização cicatricial superficial resultando em melhor fechamento da ferida cirúrgica indicando que o uso do LED apresenta efeitos benéficos sobre o sítio cirúrgico alveolar pós exodontia.

A Microtomografia computadorizada (Micro-CT) oferece significativo potencial para a identificação de estruturas mineralizadas, a técnica produz imagens 3-D de osso, permitindo a análise pormenorizada da arquitetura óssea e anisotropia<sup>135</sup>.

A ação do LED verificada pela Microtomografia no trabalho executado, avaliou a densidade e volume ósseo entre os grupos. Houve melhora significativa na densidade óssea no grupo Biomaterial+LED e Biomaterial em relação aos grupos controle e LED aos 30 dias e não houve diferença significativa entre os grupos aos 15 dias, indicando ação progressiva do LED no grupo Biomaterial+LED, ao longo do tempo mesmo após cessar as aplicações.

De maneira semelhante comportou-se o volume ósseo, no qual há aumento do volume nos grupos Biomaterial, Biomaterial+LED e basal em relação ao grupo controle aos 15 dias. E aos 30 dias o grupo basal ainda apresenta maior volume que os grupos controle e LED nos quais há ausência do dente e biomaterial. A perda do dente resultará em perda significativa do volume ósseo

demonstrado em muitos estudos na literatura<sup>30, 33, 34, 36</sup>. **Erro! Indicador não definido.** E a presença de biomaterial com ou sem LED mantém o volume e densidade óssea no processo alveolar<sup>136</sup>. Não há diferença volumétrica quando comparamos adição do biomaterial com ou sem tratamento com LED, visto nos grupos Biomaterial e Biomaterial+LED. O volume ósseo mostrou melhora significativa entre os tempos 15 e 30 dias no grupo Biomaterial+LED.

Diante disso, formulamos hipótese de que o LED atua ao longo do tempo, gerando evolução tanto na densidade como no volume ósseo e permite discussão e realização de estudos futuros que elucidem melhor a ação deste tipo de luz na neoformação óssea com utilização de biomateriais.

A avaliação histológica clínica das lâminas, concorda que a perda do dente ocasiona grande atrofia óssea alveolar visto no grupo Controle e LED porém, mais evidente no grupo controle aos 30 dias.

O tratamento com LED nos grupos LED e Biomaterial+LED, melhora a maturação óssea e organização tecidual com menores áreas de reabsorção do osso alveolar, desta maneira a fotobiomodulação com LED promoveu atividade positiva no tecido ósseo.

No entanto, a análise quantitativa das lâminas coradas tanto com HE como com Picrossírius Red, não demonstraram diferenças estatísticas significativas entre as amostras, entre os tempos e tão pouco foram observadas interações tanto para matriz e não matriz ou quanto às fibras colágenas e fibrilas. Portanto, as flutuações observadas são variações aleatórias inerentes ao processo de medição.

Relatos legitimando o efeito da fotobiomodulação no reparo ósseo observaram que há êxito na viabilidade de osteoblastos, deposição de colágeno e formação óssea com uso da TFBM (Terapia com Fotobiomodulação) principalmente na irradiação com infravermelho e que não apenas a dose total de irradiação é responsável pela ação estimulante, mas também o tempo e modo de irradiação são importantes<sup>106</sup>.

Os parâmetros e propriedades dos dispositivos são os responsáveis diretos pela observação dos efeitos celulares e teciduais. Dessa forma para que a biomodulação seja observável e positiva a seleção desses atributos deve ser correta e apropriada<sup>137, 138</sup>. Em pesquisa na literatura, com *Laser* e tecido ósseo, salienta que é difícil comparar os estudos sobre os efeitos do *Laser* de baixa intensidade no tecido ósseo, pois os parâmetros dosimétricos, modelos experimentais e duração de tratamento são muito distintos. Além disso a ausência de uma janela terapêutica específica para a dosimetria no tratamento de consolidação óssea torna o uso clínico da terapia a *laser* muito limitado<sup>111</sup>.

Embora os mecanismos da TFBM não estejam devidamente elucidados e não haja um consenso definido sobre o melhor protocolo para uso do LED na regeneração óssea com utilização de biomateriais, os resultados do presente estudo não demonstraram melhora substancial na qualidade óssea quando comparados apenas ao uso de biomateriais, mas sugerem resultados positivos do LED tanto na organização tecidual após a injúria como na maturação do osso ao longo do tempo, necessitando de estudos futuros que esclareçam sua ação e uso para melhora da qualidade óssea de biomateriais em enxertias para preservação do osso alveolar e da arquitetura óssea local.



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo não demonstrou impacto positivo significativo da fotobiomodulação com LED  $\lambda = 850$  nm na qualidade óssea do biomaterial *scaffold* enxertado quando comparam-se os grupos em que utilizou-se o biomaterial associado ou não ao tratamento com LED. Não foi demonstrado diferença tanto na densidade como no volume ósseo ou mesmo quantidade de fibras colágenas e fibrilas entre estes grupos; bem como, entre os grupos apenas exodontia e exodontia e tratamento com LED.

No entanto, os resultados nos grupos em que houve aplicação do LED  $\lambda = 850$  nm, apresentaram melhor organização tecidual e aceleração da maturação óssea alveolar, evidenciando atuação positiva desta luz no tecido ósseo e propondo que novos estudos com diferentes parâmetros dosimétricos sejam realizados para que seja estabelecido um protocolo seguro na utilização e melhora da neoformação óssea associado ou não à biomateriais.

Apesar do Biomaterial utilizado, Straumann® Cerabone®,possuir largo uso na odontologia e amplos estudos de sua eficácia em seres humanos, no modelo de amostra utilizado na pesquisa não apresentou tamanho compatível de suas partículas para alvéolos dentais de ratos *Wistar* não tendo total e adequado preenchimento do processo alveolar nestes animais, deixando dúvidas sobre os prejuízos com isso causados na amplitude dos resultados obtidos no estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> Junqueira, Luiz Carlos; Carneiro, José. *Histologia Básica: texto e atlas*. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- <sup>2</sup> Ross MH, Reith EJ, Romrell. *Histologia: texto e atlas*. 6. ed. RJ: Guanabara Koogan, 2012. 98p.
- <sup>3</sup> Bianco P. , Riminucci M. , Gronthos S. , *et al.* Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001, 19: 180–192.
- <sup>4</sup> Misch CE: Bone character: second vital implant criterion, *Dent Today* 1998; 7: 39-40.
- <sup>5</sup> Ducy P, Desbois C, Boyce B. , *et al.* Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996; 382: 448–452.
- <sup>6</sup> Diniz JS, Dionísio VC, Nicolau RA, Pacheco MTT. Propriedades mecânicas do tecido ósseo: Uma revisão bibliográfica. In: Encontro latino americano de iniciação científica, 9. ; Encontro latino americano de pós graduação, 5. , 2009, São José dos Campos, SP. Anais. . . São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2009. 3p.
- <sup>7</sup> EINHORN, T. , Remodelacion óssea durante la reparacion de las fracturas. Sandorama especial Sandoz Pharma S. A. , 1993.
- <sup>8</sup> Xu T, Bianco P, Fisher LW, *et al.* Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat. Genet.* 1998; 20: 78–82.
- <sup>9</sup> Ten Cate AR. *Histologia Bucal-Desenvolvimento, Estrutura e Função*. 5ª Ed Guanabara Koogan 2001.
- <sup>10</sup> Ribeiro, Krukemberghe Divino Kirk da Fonseca. "Tecido ósseo"; *Brasil Escola*. Disponível em <<https://brasilestela.uol.com.br/biologia/tecido-osseo.htm>>. Acesso em 20 de março de 2019.
- <sup>11</sup> Cotram RS, Kumar V, Collins T. Ossos, articulações e tumores de partes moles. In: Cotram RS, Kumar V, Collins T. *Robbins patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005; p. 1088-90.
- <sup>12</sup> Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral. Texto-atlas-correlações clínicas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- <sup>13</sup> Doblaré M, Gárcia JM, Gómez MJ. Modelling bone tissue fracture and healing: A Review. *Engineering Fracture Mechanics*, vol. 71: 13-14, Elsevier 2004.
- <sup>14</sup> Marieb EN, Holhn K. *Anatomia Humana*. 3ª ed, Porto Alegre: Artmed, 2009.
- <sup>15</sup> Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1092:385-396.
- <sup>16</sup> Radulski DR. Sistema RANK/RANKL/OPG na resposta febril induzida por endotoxina em ratos machos e fêmeas. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia, 2018.
- <sup>17</sup> Hanada, R. , A. Leibbrandt, T. Hanada, S. Kitaoka, T. Furuyashiki, H. Fujihara, J. Trichereau, M. Paolino, F. Qadri, R. Plehm, S. Klaere, V. Komnenovic, H. Mimata, H. Yoshimatsu, N. Takahashi, A. von Haeseler, M. Bader, S. S. Kilic, Y. Ueta, C. Pifl, S. Narumiya and J. M. Penninger. "Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. " *Nature*, 2009, 462(7272): 505-509.
- <sup>18</sup> Junqueira LC, Carneiro J. Tecido ósseo. In: Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan 2004; p. 111-128.
- <sup>19</sup> Katchburian E, Cerri PS. Formação e destruição óssea. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. *Cirurgia para implantes*. São Paulo: Artes Médicas 2002; p. 437-45.
- <sup>20</sup> Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Ciba T, Murata A, Sato K, *et al.* T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and INF- $\gamma$ . *Nature*. 2000; 408: 600-5.
- <sup>21</sup> Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Farmacologia*. 7ª edição. São Paulo Elsevier; 2012. Disponível em: <http://elseviersaude.com.br/wp-content/uploads/2012/09/e-sample-rang.pdf>.
- <sup>22</sup> Adaptação Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva
- <sup>23</sup> Vieira JCAGH. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 1999; 43: 415–422.
- <sup>24</sup> Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008; 473: 139–146.

- 
- <sup>25</sup> Peres MA, Barbato PR, Reis SCG, Freitas CHSdeM, Antunes JLF. Perdas dentárias no Brasil: análise da Pesquisa Nacional de Saúde Bucal 2010. *Rev Saúde Pública*. 2013; 47:78-89.
- <sup>26</sup> Hugo FN, Hilgert JB, de Sousa Mda L, da Silva DD, Pucca GA Jr. Correlates of partial tooth loss and edentulism in the Brazilian elderly. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2007;35(3):224-32.
- <sup>27</sup> De Marchi RJ, Hugo FN, Hilgert JB, Padilha DMP. Association between oral health status and nutritional status in south Brazilian independent-living older people. *Nutrition*. 2008;24: 546–553.
- <sup>28</sup> Gerritsen AE, Allen PF, Witter DJ, Bronkhorst EM, Creugers NHJ. Tooth loss and oral health-related quality of life: a systematic review and meta-analysis. *Health Qual Life Outcomes*. 2010; 8:126-136.
- <sup>29</sup> Silva ET, Oliveira RT, Leles CR. Fatores associados ao edentulismo funcional em idosos brasileiros. *Com. Ciências Saúde*. 2016; 27(2):129-138 1.
- <sup>30</sup> Barone A, Aldini NN, Fini m, Giardino R, Guirado JLC, Covani U. Xenograft versus Extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical and Histomorphometric study. *J. Periodontol* 2008; 79(8):1370-77.
- <sup>31</sup> Pelegrine AA, Aloise AC, de Macedo LGS, Teixeira ML. A medula é a mãe do osso. Os novos caminhos da implantodontia. *IN* 2017; 5:113-133.
- <sup>32</sup> Saito S, Shimizu N : Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics* 1997, 111:525 - 532.
- <sup>33</sup> Araújo M, Lindhe J. (2009) Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: a 6 months study in the dog. *Clin. Oral. Impl Res*. 20, 2009; 433-440.
- <sup>34</sup> Araújo MG, Sukekava F, Wenntiom JL, Lindhe J. Ridge alterations following implant placement in fresh extraction sockets: an experimental study in the dog. *J. Clin periodontal* 2005; 32:645-52.
- <sup>35</sup> Calansas-Maia MD, Fernandes GV, Granjeiro JM, Preservação alveolar com enxertos após exodontias e previamente à colocação de implantes. *Rev. Implantnews* 2008, 5(6): 583-90.
- <sup>36</sup> Cardarapoli G, Araújo M, Lindhe J, Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J. Clin. Periodontal* 2003; 30: 809-818.
- <sup>37</sup> Pietrovsky J, Massler M. Alveolar ridge resorption following tooth extraction. *J. Pros. Dent* 1967; 17(1):21-27.
- <sup>38</sup> Ye F, Lu X, Wang J, Shi Y, Zhang L, Chen j, Li Y, Bu H. A long-term evaluation of osteoinductive HA/  $\beta$ - Tcp ceramics in vivo: 4, 5 year study in pigs. *J. Mater Sci: Mater Med* 2007, 18: 2173-2178.
- <sup>39</sup> Weijden VD, Dell'aqua F, Slot DE. Alveolar bone dimensional changes of post extraction sockets in humans: A systematic review. *J. Clin. Periodontal* 2009; 36: 1048-1058.
- <sup>40</sup> Yilmaz S, Efeoglu E, kiliç AR. Alveolar ridge reconstruction and/or preservation using root form bioglass cones. Case reports. *J. Clin. Periodontal* 1998; 25: 832-839.
- <sup>41</sup> Zitzman NU, Scharer P, Marinello CP, Schupbach P, Berglundh T. Alveolar ridge augmentation with Bio-oss: a histologic study in humans. *J. Periodontics Restorative Dent*. 2001, 21(3): 288-95.
- <sup>42</sup> Araújo MG, Liljenberg B, Lindhe J. Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: na experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2010, 21(1):55-64.
- <sup>43</sup> Misch CE: *Contemporary Implant Dentistry*, 3rd edition, Elsevier, 2008; 10:178-199.
- <sup>44</sup> Graves DT, Oates T, Garlet P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* , v. 3, n. 17, 2011.
- <sup>45</sup> Misch CE: *Contemporary Implant Dentistry*, 3rd edition, Elsevier, 2008; 10:178-199.
- <sup>46</sup> Misch CE: Bone character: second vital implant criterion, *Dent Today*; 1998 7: 39-40.
- <sup>47</sup> Misch CE: Density of bone: effect on treatment plans, surgical approach, healing, and progressive loading, *IntJ Oral implant* 1990; 6:23-3.
- <sup>48</sup> Sjöström M, Sennerby L, Lundgren S. Bone graft healing in reconstruction of maxillary atrophy. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013;15(3):367-79.
- <sup>49</sup> Bergkvist G, Koh KJ, Sahlholm S, Klintstrom E, Lindh C. Bone density at implant sites and its relationship to assessment of bone quality and treatment outcome. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 2010, 25: 321–328.

- <sup>50</sup>Javed F, Romanos GE. The role of primary stability for successful immediate loading of dental implants. A literature review. *Journal of Dentistry* 2010; 38: 612–620.
- <sup>51</sup>Merheb J, Van Assche N, Coucke W, Jacobs R, Naert I, Quirynen M. Relationship between cortical bone thickness or computerized tomography derived bone density values and implant stability. *Clinical Oral Implants Research*, 2010; 21: 612–617.
- <sup>52</sup>Miyamoto I, Tsuboi Y, Wada E, Suwa H, Iizuka T. Influence of cortical of cortical bone thickness and implant length on implant stability at the time of surgery-clinical, prospective, biomechanical, and imaging study. *Bone*, Elsevier, 2005.
- <sup>53</sup>Linkon LI, Chercheve R: *Theories and techniques of implantology*, vol 1, St Louis, Mosby, 1970.
- <sup>54</sup>Lekholm U, Zarb GA. Patient selection and preparation. In: Brånemark, P. -I. , Zarb GA, Albrektsson T. *Tissue Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Chicago: Quintessence Publ Co. 1985; 199–209.
- <sup>55</sup>Microtomografia Computadorizada Skyscan 1272 in Vivo- Lnano CNPEN. <https://lnnano.cnpem.br/laboratories/lmn/facilities/x-ray-microtomograph/>. Acesso em 15/05/2019.
- <sup>56</sup>Drexler W; Fujimoto JG. *Optical Coherence Tomography: Technology and Applications*. 2015, 2. ed. Cham: Springer.
- <sup>57</sup>Bouma BE. ; Tearney GJ. *Handbook of optical coherence tomography*. 2002, 1. ed. New York: Marcel Dekker.
- <sup>58</sup>Microtomografia Computadorizada- Skyscan 1176 In Vivo-IB-USP. [http://www. ib. usp. br/pesquisa/microtomografia-computadorizada-skyscan-1176-in-vivo](http://www.ib.usp.br/pesquisa/microtomografia-computadorizada-skyscan-1176-in-vivo), acesso em 09/09/2018.
- <sup>59</sup>Argenta MA, Buriol TM, Hecke MB. Metodologia para obtenção de parâmetros físicos e geométricos do osso trabecular função de imagens de micro tomografia. [http://www. grupo. bioengenharia. ufpr. br/arquivos/ArtigoCILAMCE2010-MKpar. pdf](http://www.grupo.bioengenharia.ufpr.br/arquivos/ArtigoCILAMCE2010-MKpar.pdf), acessado em 20/03/2019.
- <sup>60</sup>Mangano C, Piatelli A, Perrotti V, Iezzi G. Dense hydroxyapatite inserted into postextraction socket: A histologic and histomorphometric 20-year case report. *J. Periodontol*, 2008; vol 79, 5:929-933.
- <sup>61</sup>Serino G, Biancu S, Iezzi G, Piatelli A. Ridge preservation following tooth extraction using a polylactide and polyglycolide sponge as space filler: A clinical and histological study in humans. *Clin Oral Implants Res* 2003, 14(5): 651-8.
- <sup>62</sup>. Mezzomo LAM. *et al.* Alveolar ridge preservation after dental extraction and before implant placement: A literature review. *Rev. Odont. Cienc.* 2011; 26(1): 77-83.
- <sup>63</sup>Jahangiri L, Devlin H, Ting K, Nishimura I. Current perspectives in residual ridge remodeling and its clinical implications: A review. *J. Prosthet Dent* 1998; 80:224-37.
- <sup>64</sup>Camargo PM. *Et al.* Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. *Oral Surgery oral medicine oral pathology* 2000, vol. 90, 5: 581-86.
- <sup>65</sup>Iasella JM. *Et al.* Ridge preservation with Freeze-Dried Bone allograft and a collagen membrane compared to extraction alone for implant site development: A clinical and histologic study in humans. *J. Periodontal*, 2003. Vol. 74, 7: 990-999.
- <sup>66</sup>Proubasta J, Mur JG, Planell JA. Biocompatibilidad, materiales implantables, tipos de implante. In: *Fundamentos de Biomecânica y Biomateriales*, Ediciones Ergon. Madrid. 1997; 271-350.
- <sup>67</sup>Davies JE. Histodynamics of endosseous wound healing. In: Davies JE, editors. *Bone engineering*. Canada: EM2. 2000; 1-11.
- <sup>68</sup>Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res* 2001; 31:81-110.
- <sup>69</sup>Covey DC, Albright JA. Clinical induction of bone repair with demineralized bone matrix or a bone morphogenetic protein, *Orthop Rev* 1989; 18:857-863.
- <sup>70</sup>Glowacki J, Mulliken JB: Demineralized bone implants, *Clin Plast Surg* 1985; 12: 233-241.
- <sup>71</sup>Feighan JE, Davy D, Prewett AB *et al*: induction of bone by a demineralized bone matrix gel: a study in a rat femoral defect model, *J Orthop Res* 1995; 13:88.
- <sup>72</sup>Sigurdsson TJ, Nygaard L, Tatakis DN *et al*: periodontal repair in dogs: evaluation of rh BMP-2 carries, *Int J Periodontics Restorative Dent* 1999; 16:524-537.
- <sup>73</sup>Takikawa S, Diegmann MH, Scarborough NI: Osteoinduction of human demineralized bone: characterization in rat model, *clin Orthop Relat Res* 1998; 357:219-228.
- <sup>74</sup>Wang Ea, Rosen V, D'Alessandro JS *et al*: Recombinant human bone morphogenic protein induces bone formation, *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:2220-2224.

- <sup>75</sup>Mester E, Mester AF, and Mester A: The biomedical effects of laser application. *Lasers in Surgery and Medicine*. 1985; 5: 31 - 39.
- <sup>76</sup>Jarcho M: Calcium phosphate ceramics as hard prosthetics, *Clin Ortop* 1981; 157:259-278.
- <sup>77</sup>Kent Jn, Jarcho M: ridge augmentation procedures with hydroxylapatite. In Fonseca Js, Davis WH, editors: *Reconstrutive preprosthetic oral and maxillofacial surgery*, WB Saunder, ed 2, Philadelphia, 1995.
- <sup>78</sup>LeGeros RZ: Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review, *Adv Dent Res* 1980; 2:164-180.
- <sup>79</sup>Reddi AH, Marshall R. Urist: A renaissance scientist and orthopedic surgeon. *J Bone Joint Surgery Am* 2003; 85:3-7.
- <sup>80</sup>Salama R, Burwell RG, Dickson IR: Recombined grafts of bone and marrow, *J Bone Joint Surg* 1973; 55:402-417.
- <sup>81</sup>Hoexter DL. Bone regeneration graft materials. *J Oral Implantol*. 2002; 28(6):290-4.
- <sup>82</sup>Daelemans P, Hermans M, Godet F, Malevez C. Autologous bone graft to augment the maxillary sinus in conjunction with immediate endosseous implants: a retrospective study up to 5 years. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1997;17(1):27-39.
- <sup>83</sup>Davies N, Dobner S, Bezuidenhout D, Schimidt C, Beck M, Zisch A. H, Zilla P. The dosage dependence of VEGF stimulation on scaffold neovascularisation. *Biomaterials*, 2008.
- <sup>84</sup>Área Terapêutica: alvéolo pós extração- informação científica. Disponível em: <<https://www.geistlich.com.br/pt/dentistas/area-terapeutica/alveolo-pos-extracao/informacao-cientifica/>> acesso em março, 2019.
- <sup>85</sup>Holtrap ME, Cox KA, Glowacki J. Cells of the mononuclear phagocytosis system resorb implant's bone matrix: a histologic and ultrastructural study, *Calcif Tissue Int* 1982; 34:488-494.
- <sup>86</sup>Aboelsaad Ns *et al.* effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study). *Lasers Med Sei* 2009; 24:387-395.
- <sup>87</sup>Cavalcanti Tm. *et al.* Conhecimento das propriedades físicas e da interação do laser com os tecidos biológicos na odontologia. *An Bras. Dermatol* 2011; 86(5): 955-60.
- <sup>88</sup>Freitas NR, Guerrini LB, Esper LA, Sbrana MC, Dalben GS, Soares S, Almeida ALPF. Evaluation of photobiomodulation therapy associate with guided bone regeneration in critical size defects. In vivo study. *Journal of Applied Oral Science*, vol. 26, 2018.
- <sup>89</sup>Natal AMD. Influência do pH na interação do Photofrin®, Photogem® e Photosan® com DMPC e lipoproteína de baixa densidade [Dissertação de Mestrado] [Internet]. [Cited 2014 Apr 28]. São Carlos: Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos; 2007. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-27032008-110609/>.
- <sup>90</sup>Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem Photobiol*. 1992;55(1):89-96.
- <sup>91</sup>Nitzan Y, Pechatnikov I. Approaches to kill gram-negative bacteria by photosensitized processes. In: Hamblin MR, Jori G. *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*. Reino Unido: RSC Publishing; 2011; 45-67.
- <sup>92</sup>Karu TI; Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(4):355-61.
- <sup>93</sup>Schubert EF. Light-Emitting Diodes. *Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering*. 2014; 1-10.
- <sup>94</sup>Karu TI. Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and NearIR Radiation. *Photochemistry and Photobiology*. 2008;84(5):1091-9.
- <sup>95</sup>Corazza AV. Fotobiomodulação comparativa entre o Laser e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas de ratos. 2005, Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- <sup>96</sup>Sacono NT, Costa CA, Bagnato VS, Abreu-e-Lima FC. Light-emitting diode therapy in chemotherapy-induced mucositis. *Lasers Surg Med*. 2008;40(9):625-33.
- <sup>97</sup>Casado PL, Duarte mE, Carvalho W, Silva LE, Barboza EP. Ridge bone maintenance in human after extraction. *Implant Dentistry* 2010; 19(4): 314-320.
- <sup>98</sup>Martinez MEM, Pinheiro AIB, Ramalho LMI. Effect of IR laser photobiomodulation on the repair of bone defects grafted with organic bovine bone. *Laser Med Sci*, 2008, 23:313-317.
- <sup>99</sup>Renno ACM, McDonnel PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation *in vitro*. *Photomed Laser Surg*, 2007; 25:275-80.

- <sup>100</sup> Pinheiro ALP, and Frame JF: Laser em Odontologia: Seu Uso Atual e Perspectivas Futuras. Revista Gaucha de Odontologia 1992, 40: 327 - 332.
- <sup>101</sup> Trelles MA, Mayayo E: Bone fracture consolidates faster with low-power laser. Lasers in Surgery and Medicine 1987, 7:36 - 45.
- <sup>102</sup> Karu T. The science of low power laser therapy. Australia: Gordon and Breach Science Publishers, 1998.
- <sup>103</sup> Pinheiro ALB, Oliveira MAM, Martins PPM. Biomodulação da cicatrização óssea pós-implantar com o uso da laserterapia não-cirúrgica: Estudo por microscopia eletrônica de varredura. Rev. FOUFBA. 2001; 22, 12–19.
- <sup>104</sup> Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H, Sano K, Nishisaka T, Ozawa H. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblast. Bone, 2007; 40:140-148.
- <sup>105</sup> Nicolau R, Jorgetti V, Pacheco JRM, Reis LM, Zangaro AZ. Effect of low-power GaAlAs laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. Laser Medicine Science, 2003; 18:89-94.
- <sup>106</sup> Pinheiro ALB, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair process. Photomed and Laser Surgery, 2006, 4:169-178.
- <sup>107</sup> Islam MN, Zakaria GA, Sirazee FH. Effects of low level laser (Diode- 830 nm) therapy on Human bone regeneration. 3<sup>o</sup> International Conference on Advanced Clinical Research and Clinical Trials. J. Clin Res Bioeth, 2017.
- <sup>108</sup> Romão MMA. Efeito da laserfototerapia na reparação de osso alveolar humano: análise microtomográfica e histomorfométrica. Acervo on line USP: [www.teses.usp.br/teses/disponiveis/.../MarciaMariaAltavistaRomaoVersaoCorrigida.pdf](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/.../MarciaMariaAltavistaRomaoVersaoCorrigida.pdf). Acesso em 24 de Abril de 2018.
- <sup>109</sup> Cardoso MV. Efeitos da fotobioestimulação por laser e LED nas células da granulação óssea. Acervo on line USP: São Paulo, 2017. Artigo disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25146/tde-28092017-193857/en.php>. Acesso em 07. 10. 2019.
- <sup>110</sup> Bossini OS, Rennó ACM, Ribeiro DA, Fangel R, Ribeiro AC, Lahoz M de A, Parizotto NA. Low level laser therapy (830 nm) improves bone repair in osteoporotic rats: Similar outcomes at two different dosages. Experimental Gerontology 47. 2012; 136–142.
- <sup>111</sup> Bossini PS. Efeitos do laser de baixa intensidade e do biosilicato<sup>®</sup> no reparo ósseo de ratas osteopênicas. Tese de doutorado Paulo Sérgio Bossini- 2010, São Carlos: UFSCar.
- <sup>112</sup> Page R, Schroeder H. Periodontitis in man and other animals: a comparative review. 1982, Basel: Karger.
- <sup>113</sup> Frenkel JK. Models for infectious diseases. Fed Proc. 28. 1969; (1):179-90.
- <sup>114</sup> Jordan HV. Rodent model systems in periodontal disease research. J. Dent Res. 50. 1971; (2):236-42.
- <sup>115</sup> Ramos AGG. Efeitos do Laser de Baixa Intensidade na fotobiomodulação óssea, após exodontia de molares em ratos espontaneamente hipertensos. Dissertação apresentada à ao programa de Pós-Graduação em Biofotônica aplicada à área da Saúde da Universidade Nove de Julho para obtenção do título de Mestre, 2016.
- <sup>116</sup> Informações Straumann <https://www.straumann.com/content/dam/sites/neodent/br/biomateriais/brochuras/490.353%20-%20cerabone.pdf> Acesso em 20/08/2019
- <sup>117</sup> CEM- Propes-Ufabc. [http://propes.ufabc.edu.br/cem/crbst\\_139.html](http://propes.ufabc.edu.br/cem/crbst_139.html)
- <sup>118</sup> Monção M M, Rosa FP Estudo das propriedades físicas de um biomaterial com nova composição de wollastonita e beta fosfato tricálcico para regeneração óssea após implante in vivo. Rev. Cienc. Med. Biol. , 2019, v. 18, n. 2, p. 239-248.
- <sup>119</sup> Terena SML, Fernandes KPS, Bussadori SK, Junior AB, Silva DFT, Magalhães EMR, Ferrari RAM. Infrared Laser Improves Collagen Organization in Muscle and Tendon Tissue During the Process of Compensatory Overload. Photomedicine and Laser Surgery, 2017, Volume XX, Number XX.
- <sup>120</sup> Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. Anal quant Cytol Histol 2001; 23:291–299.
- <sup>121</sup> Pinheiro ALB, Limeira Jr FA, Gerbi MEMM, *et al.* Effect of 830nm laser Light on the Repair of Bone Defects Grafted with Inorganic Bovine Bone and Decalcified Cortical Osseous Membrane, Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery. 2003; 21:383-8.

- <sup>122</sup>Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir Bras. Scielo Brasil*. 2004;19(4):441-7.
- <sup>123</sup>Lopes CB *et al.* Infrared Laser Photobiomodulation (830 nm) on bone tissue around dental implants: a Raman spectroscopy and scanning electronic microscopy study in rabbits. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2007. 25(2): 96-101.
- <sup>124</sup>Soares LGP, Marques AMC, Guarda MG, Aciole JMS, Pinheiro ALB, Santos JN Reparação de defeitos ósseos cirúrgicos enxertado com hidroxiapatita +  $\beta$ - TCP e irradiadas enxertado com hidroxiapatita +  $\beta$ - TCP e irradiadas enxertado com hidroxiapatita +  $\beta$ - TCP e irradiadas com  $\lambda = 850$  nm de luz LED *Brazilian Dental Journal*. 2015; 26 (1): 19-25.
- <sup>125</sup>Rosa CB, Castro VIC, Reis Júnior JA *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; 29(3):1251-9.
- <sup>126</sup>Pagin MT, Oliveira FA, Oliveira RC. Laser and light-emitting diode effects on pre-osteoblast growth and differentiation. *Lasers Med Sci*. 2014; 29:55-59.
- <sup>127</sup>Li WT, Leu YC, Wu JL, Red-light light-emitting diode irradiation increases the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells, *Photomedicine and Laser Surgery* 28. 2010; 157-165.
- <sup>128</sup>Pinheiro ALB *et al.* Biomechanical changes of the repair of surgical bone defects grafted with biphasic synthetic micro-granular HA+ $\beta$  tricalcium phosphate induced by laser and LED phototherapies and assessed by Raman spectroscopy. *Lasers Med Sci*. 2017; 32:663-672.
- <sup>129</sup>Zambuzzi WF, Neves MC, Oliveira RC, Silva TL, Cestari TM, Busalaf MA, Granjeiro JM, Taga R, Taga EM. Reação tecidual e perfil de fosfatases após o implante de matriz óssea desmineralizada xenogênica em músculo de ratos. *Cienc Odontol Bras* 2005 abr. /jun. ; 8 (2): 90-98.
- <sup>130</sup>Lutolf MP, Weber FE, Schmoekel HG, Schense JC, Kohler T, Muller R, *et al.* Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nat Biotechnol*. 2003 May; 21 (5):513-8.
- <sup>131</sup>Del-Valle M, Lins E, P Ana. Assessment of simulated osteoporosis in alveolar bone using optical coherence tomography. 2019, *Journal of biophotonics - Wiley Online Library*.
- <sup>132</sup>Negrutiu ML. *et al.* Bone regeneration assessment by optical coherence tomography and micro-CT synchrotron radiation. In: *Proceedings of SPIE - Optical Coherence Tomography and Coherence Techniques VI*. Sao Francisco: [s. n. ], 2013. v. 8802, p. 880204-1-880204-6.
- <sup>133</sup>Cara ACB. *et al.* Evaluation of two quantitative analysis methods of optical coherence tomography for detection of enamel demineralization and comparison with microhardness. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2014; 46(9):666-671.
- <sup>134</sup>Muja C *et al.* Optical path-length spectroscopy of incipient caries lesions in relation to quantitative light-induced fluorescence and lesion characteristics. *Applied Optics*, 2003; 42(16):2986.
- <sup>135</sup>Park CH, Abramson ZR, Taba M Jr, *et al.* Three Dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *J Periodontal* 2007; 78:273-281.
- <sup>136</sup>Castro-Silva IL, Zambuzzi WF, Granjeiro JM. Current overview of the use of xenograft in dentistry. *Innov Implant J, Biomater Esthet*, 2009, v. 4, n. 3, p. 70-75.
- <sup>137</sup>Arany PR. Craniofacial Wound Healing with Photobiomodulation Therapy: New Insights and Current Challenges. *J Dent Res*. 2016; 95(9):977-84.
- <sup>138</sup>de Freitas LF, Hamblim MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. 2016; (3):22.

## Anexos

### Anexo A- Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética Animal.



Comissão de Ética no  
Uso de Animais

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do LED no reparo ósseo de alvéolos dentais de ratos pós exodontia enxertado com osso bovino inorgânico e membrana de colágeno.", protocolada sob o CEUA nº 8097130818 (ID 000079), sob a responsabilidade de **Alessandro Melo Deana e equipe; Vanessa Dalapria** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 13/11/2018.

We certify that the proposal "Effect of LED on the bone repair of dental alveoli of rats after exodontia grafted with inorganic bovine bone and collagen membrane.", utilizing 48 Heterogenics rats (48 males), protocol number CEUA 8097130818 (ID 000079), under the responsibility of **Alessandro Melo Deana and team; Vanessa Dalapria** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 11/13/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 11/2018 a 11/2020

Área: Biofotônica Aplicada Às Ciências da Saúde

Origem: Biotério - Unidade Vergueiro

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 12 a 12 semanas N: 48

Linhagem: Wistar

Peso: 300 a 300 g

Local do experimento: Biotério Universidade Nove de Julho



---

São Paulo, 13 de novembro de 2018



Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho



Profa. Dra. Stella Regina Zamuner  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho