



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**



**ANNA LUIZA NUNES RODRIGUES**

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE IRRADIAÇÃO DE LASER  
INFRAVERMELHO SOBRE O REPARO EM ÁREAS ENXERTADAS COM OSSO  
BOVINO DESPROTEINIZADO**

**UBERLÂNDIA**

**2023**

ANNA LUIZA NUNES RODRIGUES

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE IRRADIAÇÃO DE LASER  
INFRAVERMELHO SOBRE O REPARO EM ÁREAS ENXERTADAS COM OSSO  
BOVINO DESPROTEINIZADO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Graduação em Odontologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, como exigência parcial  
para obtenção do Título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme José Pimentel  
Lopes de Oliveira

UBERLÂNDIA

2023

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE IRRADIAÇÃO DE LASER  
INFRAVERMELHO SOBRE O REPARO EM ÁREAS ENXERTADAS COM OSSO  
BOVINO DESPROTEINIZADO

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado para  
obtenção de título de Cirurgião-Dentista da  
Universidade Federal de Uberlândia (MG) pela  
banca examinadora formada por:

Uberlândia, 25 de maio de 2023.

---

Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira, UFU/MG

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Karen Renata Nakamura Hiraki, UFU/MG

---

Prof. Dr. Roberto Bernardino Júnior, UFU/MG

*A meus pais Valdeci e Vilma e meu irmão Ygor.*

*Minha tia Vânia e meu padrinho Vilmar.*

*Todos os meus familiares e amigos mais próximos, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

“Se não estivermos dispostos a pagar um preço por nossos valores, se não estivermos dispostos a fazer alguns sacrifícios para realizá-los, então deveríamos nos perguntar se realmente acreditamos neles.” (Barack Obama).

Essa frase resume bem o que foi esse período da estrada da minha vida: sacrifício! Quantas vezes eu duvidei, quis desistir, fraquejei, pestanejei e chorei, pensando não ser capaz. Mas as nossas conquistas vêm do nosso esforço e renúncia diários; portanto, com tantos altos e baixos, sorrisos e lágrimas: aqui estou.

Estou para agradecer primeiramente a Deus pela oportunidade de viver grandes dias de um sonho sonhado há tantos anos; pelo amparo, auxílio, bênção e proteção em cada passo. Não houve um sequer dia que eu estivesse realmente só, pois em tudo, Ele me sustentava e me fazia crer nos tais famigerados planos impossíveis. “Porque para Deus, nada é impossível” (Lc 1, 37).

Também gostaria de eternizar os meus sinceros agradecimentos aos meus pais que, de joelhos nos chãos, me davam forças quando nem eu mesma acreditava que tinha. Vocês são minha inspiração de cada dia, meu exemplo de amor, de carinho, de cuidado e de respeito. Como eu sou feliz por tê-los comigo! Mesmo eu não sabendo demonstrar tão bem, é sempre por causa de vocês o bem que eu procuro fazer.

Além desses, deixo um obrigada especial ao meu irmão Ygor, minha tia Vânia e meu padrinho Vilmar que foram peças fundamentais para minha estadia em Uberlândia durante todos esses anos. Vocês têm um lugar especial no meu coração!

Agradeço ainda aos meus amigos de faculdade que se tornaram amigos para a vida: vocês não sabem o bem que me fazem! Quando me mudei para essa cidade, sozinha, eu só pedi a Deus que colocasse pessoas boas no meu caminho. Não poderia receber alguém melhor que vocês para estar comigo todos esses anos, suportando e vivendo as dores e alegrias de cada momento desse nosso curso.

Por fim, agradeço a todos os docentes e equipe de coordenação e direção da FOUFU que, de maneira ímpar, não mediram esforços para minha formação. De maneira particular, deixo registrado meu eterno respeito e admiração ao meu orientador, professor doutor Guilherme que, humildemente, ensina-me o que sabe sem cessar. A todos, muito obrigada!

## RESUMO

**Objetivo:** Comparar o efeito de diferentes números de sessões de irradiação do laser de baixa intensidade (PBMT) com luz infravermelha sobre o reparo em áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado (OBD).

**Materiais e métodos:** Foram utilizados 36 ratos, divididos em 3 grupos de 12 animais cada. O agrupamento foi de acordo com protocolo de fotobiomodulação (PBMT) com laser infravermelho que foi aplicado na área enxertada: CTR: área enxertada não irradiada; IRL4: área enxertada irradiada com o laser infravermelho em 4 sessões; IRL7: área enxertada irradiada com o laser infravermelho em 7 sessões. O procedimento cirúrgico para inserção de cápsulas contendo osso bovino desproteínizado e aplicação do laser foi realizado bilateralmente na face lateral da mandíbula e após o período de 30 e 90 dias, os animais foram eutanasiados por sobredosagem anestésica, sendo que os ramos da mandíbula foram removidos para avaliação microtomográfica, para avaliação do volume de tecidos mineralizados; e por histomorfometria para determinação da porcentagem de osso e biomaterial no espaço entre o domo e a face lateral do ramo da mandíbula.

**Resultados:** A aplicação da PBMT alterou o volume, a microestrutura do tecido enxertado e melhorou o reparo tecidual das áreas enxertadas, independentemente da quantidade de sessões de irradiação.

**Conclusão:** A PBMT melhora o reparo tecidual em áreas enxertadas tanto em 4 como em 7 sessões. Entretanto, a aplicação da PBMT em 7 sessões é mais benéfica na formação óssea em comparação às áreas enxertadas não irradiadas.

**Palavras-chave:** estudo pré-clínico; laserterapia; reparo ósseo; substitutos ósseos; fotobiomodulação.

## ABSTRACT

**Objective:** To compare the effect of different numbers of sessions of photobiomodulation (PBMT) with infrared light on the repair in grafted areas with deproteinized bovine bone (DBB).

**Materials and methods:** 36 rats were used, divided into 3 groups of 12 animals each. The grouping follows the photobiomodulation protocol (PBMT) with infrared laser to be applied to the grafted area: CTR: non-irradiated grafted area; IRL4: grafted area irradiated with infrared laser in 4 sessions; IRL7: grafted area irradiated with infrared laser in 7 sessions. The surgical procedure to insert capsules containing deproteinized bovine bone and laser application was performed bilaterally on the lateral face of the mandible and after a period of 30 and 90 days, the animals were euthanized by anesthetic overdose, and the branches of the mandible were removed to microtomographic evaluation, to evaluate the volume of mineralized tissues; histomorphometric, to determine the percentage of bone and biomaterial in the space between the dome and the lateral face of the mandibular ramus; and immunohistochemistry to detect bone morphogenetic protein (BMP-2), osteocalcin (OCN), alkaline phosphatase (ALP) and tartar-resistant acid phosphatase (TRAP).

**Results:** The application of PBMT altered the volume, the microstructure of the grafted tissue and improved the tissue repair of the grafted areas, regardless of the number of irradiation sessions.

**Conclusion:** The PBMT improves tissue repair in grafted areas in both 4 and 7 sessions. However, the application of PBMT in 7 sessions is more beneficial in bone formation when compared to non-irradiated grafted areas.

**Key words:** preclinical study; laser therapy; bone repair; bone substitutes; photobiomodulation.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
2.1	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	10
2.2	GRUPOS.....	11
2.3	IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE INFRAVERMELHO..	11
2.4	MICROTOMOGRAFIA ( $\mu$ CT).....	12
2.5	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	12
2.6	TAMANHO DA AMOSTRA.....	13
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	13
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>21</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>26</b>

## INTRODUÇÃO

O tratamento de edentulismo parcial ou total tem sido considerado como principal indicação terapêutica a utilização de próteses implanto suportadas, devido à sua melhor retenção e estabilidade (SLAGTER ET AL., 2021; GUIDA ET AL., 2020). Em uma reabilitação utilizando implantes dentários, é necessária, dentre outros fatores, uma osseointegração bem sucedida. Para tanto, o volume ósseo e o contato do osso com a superfície do implante devem ser adequados (GULINELLI ET AL., 2017; CHAVDA; LEVIN, 2018). Porém, com a perda do elemento dentário, o osso alveolar adjacente sofre um processo de remodelação óssea, por meio da reabsorção e deposição de matriz, durante o período de cicatrização da área injuriada; isso pode levar, em algumas situações, a formações de defeitos ósseos (SBORDONE ET AL., 2016). Assim, para que se obtenha um volume ósseo adequado à instalação de implantes, ou ainda, com o objetivo de neutralizar a reabsorção óssea após uma extração, têm sido aplicadas técnicas de regeneração óssea guiada associadas à utilização de substitutos de tecido ósseo.

O enxerto de osso autógeno é considerado o substituto de tecido ósseo padrão ouro devido às suas propriedades biológicas de formação óssea por osteocondução, osteoindução e osteogênese, bem como por também por ser capaz de apresentar uma reabsorção gradual e ser substituído por tecido ósseo neoformado de alta qualidade (SPIN-NETO ET AL., 2015). Entretanto, existem circunstâncias que inviabilizam a utilização do osso autógeno em todos os casos, dados os riscos de morbidade do leito doador, a limitada disponibilidade volumétrica, a necessidade de um local cirúrgico adicional e um tempo maior de cirurgia (STARCH-JENSEN ET AL., 2020). Então, como uma alternativa para essa limitação, têm sido utilizados substitutos ósseos, de origens distintas dos enxertos autógenos, que apresentam propriedades de osteocondução e que oferecem um aumento da disponibilidade óssea sem a necessidade de captação de material de uma região doadora (MEIJNDERT ET AL., 2005; PIGNATON ET AL., 2019). O osso bovino desproteínizado (OBD) se destaca dentre os materiais substitutos ósseos alternativos ao enxerto de osso autógeno, por apresentar bom potencial osteocondutor e por demonstrar resultados consistentes em diferentes aplicações clínicas, tais como: em cirurgias de levantamento de seio maxilar (PIGNATON ET AL., 2019), manutenção de alvéolos pós-extração (SBORDONE ET AL., 2016) e regeneração óssea guiada para aumento ósseo horizontal (URBAN ET AL., 2013) ou vertical (URBAN ET AL., 2017). Entretanto, o OBD apresenta limitações biológicas que reduzem a remodelação e formação óssea nas áreas enxertadas (SCHMITT ET AL., 2013), que podem

resultar em maior tempo de espera para instalação de implantes (JENSEN ET AL., 2013), e redução do grau de osseointegração (QUIROZ ET AL., 2022).

Tratamentos adjuntos têm sido propostos para associação de técnicas de enxertia com substitutos ósseos osteocondutores visando a aceleração do reparo ósseo nessas áreas (HUH ET AL., 2015). A associação com enxerto de osso autógeno ou fatores de crescimento osteoindutores tem demonstrado melhor a formação óssea em áreas enxertadas com OBD (JENSEN ET AL., 2013). Entretanto, o custo benefício e a morbidade do leito doador são fatores limitadores na aplicação dessas terapias em todos os casos (KIM ET AL., 2017; JENSEN ET AL., 2013). A fotobiomodulação (PBMT) também tem sido proposta em terapias que visam o reparo do tecido ósseo (DE MIRANDA ET AL., 2019; DE OLIVEIRA ET AL., 2018). A aplicação da PBMT com luz infravermelha (IRL) vem demonstrando acelerar o processo de reparo ósseo em fraturas (GABBAI ET AL., 2018), defeitos ósseos (DE MIRANDA ET AL., 2019) e em áreas enxertadas (DE OLIVEIRA ET AL., 2018). Estudos pré-clínicos demonstraram que a aplicação de PBMT com IRL por 7 sessão a cada 48 horas aumentaram a formação óssea (DE OLIVEIRA ET AL., 2018) e a osseointegração em áreas enxertadas com OBD e com a cerâmica bifásica a base de Hidroxiapatita e  $\beta$ -Tricálcio Fosfato (DE OLIVEIRA ET AL., 2020; DE OLIVEIRA ET AL., 2021). Entretanto, a quantidade de sessões que supostamente são necessárias para obtenção de algum efeito da PBMT em áreas enxertadas pode ser um fator clínico limitador para adesão do paciente a essa terapia.

Em outro estudo pré-clínico, foi observado um efeito positivo da PBMT com luz IRL em áreas enxertadas com osso autógeno, em um número reduzido de sessões (JAKSE ET AL., 2007). Diante dessa perspectiva, o objetivo desse estudo foi de avaliar o efeito de diferentes quantidades de sessões de PBMT com IRL sobre o reparo ósseo em mandíbulas de ratos enxertadas com osso bovino desproteínizado. A hipótese nula desse estudo é que a PBMT com IRL não influencia no processo de reparo ósseo em áreas enxertadas independentemente da quantidade de sessões aplicadas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Faculdade de Odontologia de Uberlândia, Brasil (CEUA 035-20). Foram utilizados 36 ratos da espécie *Rattus norvegicus*, variação Wistar, com peso de 250 a 300g, 3 meses de idade, tendo sido mantidos em ambiente com umidade (65-70%), temperatura ( $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), e ciclos de luz (12 horas) controlados. Os animais foram alimentados com água e ração apropriada ad libitum. O estudo seguiu o protocolo ARRIVE para condução de estudos pré-clínicos.

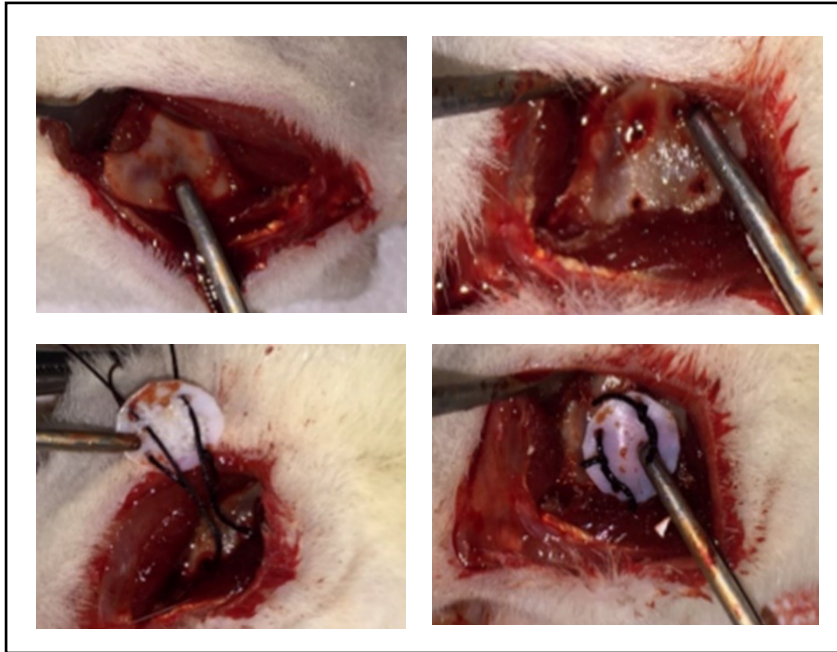
### *Procedimento Cirúrgico*

Depois que os animais foram aclimatados ao biotério por uma semana, iniciaram-se os procedimentos cirúrgicos, onde, para isso, estes animais foram anestesiados por uma combinação dos anestésicos de Quetamina com Xilazina, utilizando a proporção de 80mg/Kg de massa corporal de Cloridrato de Quetamina (Cloridrato de Quetamina 50mg/ml) e 10mg/Kg de massa corporal Cloridrato de Xilazina (Cloridrato de Xilazina- 20mg/ml) respectivamente. Na sequência, foi feita a tricotomia dos animais na região submandibular e massetéica, seguida da antisepsia do campo cirúrgico com gaze estéril, embebida em solução de povidine. Os animais operados foram colocados na posição de decúbito dorsal em mesa cirúrgica.

Em seguida, foram feitas incisões horizontais na região inferior do ramo da mandíbula, diérese do tecido muscular e do periósteo, a fim de expor a face lateral do ramo ascendente da mandíbula dos animais. Utilizando uma broca esférica, foram realizadas quatro perfurações paralelas à base da mandíbula com 0.5mm de diâmetro e a 6mm de distância uma da outra, formando as arestas de um quadrado. Previamente à cirurgia, foi customizada uma cápsula de teflon no formato de um domo, com medidas de 5mm do diâmetro externo, 2.5mm de altura e um colar periférico de 1mm. Essa cápsula foi inserida na região cirúrgica com a sua porção aberta indo ao encontro da face lateral da mandíbula; uma cápsula para cada antímero do animal (esquerdo e direito), totalizando duas cápsulas por animal. Depois, foi inserido um volume de  $0.032\text{mm}^3$  de osso bovino desproteínizado (Cerabone®, Botiss, Zossen, Alemanha) que ficou compactado dentro das cápsulas de teflon, sendo estas, posteriormente, suturadas na mandíbula utilizando o fio de seda 4.0, de maneira que estas suturas transpassassem a própria cápsula e as perfurações que foram realizadas na face lateral do ramo da mandíbula; os tecidos moles foram reposicionados sobre a cápsula e suturados com fio vicryl 4.0. No pós-operatório, os animais receberam uma dose intramuscular de pentabiótico (0,8 ml/kg) e 3 doses de cetoprofeno 1%

aplicados a cada 24 horas (1 mg/kg). Os animais foram eutanasiados por sobredosagem anestésica nos períodos experimentais de 30 e 90 dias após as cirurgias.

**Figura 1:** Imagens do procedimento cirúrgico realizado no estudo. Exposição do tecido ósseo do ramo mandibular; perfurações para inserção da cápsula teflon em forma de cúpula; inserção do biomaterial na a cúpula; fixação da cápsula teflon em forma de cúpula associada à região lateral do ramo da mandíbula.



### ***Grupos***

Os animais foram selecionados randomicamente e divididos em 3 grupos com 12 animais cada um. Cada um desses grupos foi dividido e avaliado em dois períodos experimentais diferentes: 30 e 90 dias. Portanto, totalizam 6 animais em cada grupo e período experimental. Os grupos foram divididos de acordo com o protocolo de PBMT utilizado para irradiar a área enxertada, sendo: o grupo **CTR**, onde a área enxertada não foi irradiada; o grupo **IRL4**, onde a área enxertada foi irradiada com o laser infravermelho em 4 sessões; e o grupo **IRL7**, onde a área enxertada foi irradiada com o laser infravermelho em 7 sessões.

### ***Irradiação com Laser de Baixa Intensidade Infravermelho***

Para executar as irradiações, foi utilizado o laser de GaAlAs (Therapy EC,  $\lambda$  808nm, 100 mW,  $\phi \sim 0.600\mu\text{m}$ , divergência da ponta = 0.37rad, CW, área do spot de 0,0283 cm<sup>2</sup>, DMC Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil). Para tal, a área enxertada foi delimitada com uma caneta

marcadora de tecido, logo após as suturas da região cirúrgica. Foram marcados 4 pontos com a equidistância de 3mm que serviram como um guia para o laser, de maneira a englobar toda a área irradiada. O laser foi irradiado transcutaneamente por 10 segundos em cada ponto, gerando um total de 40 segundos de irradiação por sessão. Foram executadas 4 ou 7 sessões, em seus respectivos grupos, que foram repetidas a cada 48 horas por 6 (Grupo IRL4) ou 13 dias (Grupo IRL7) após as cirurgias (Jakse et al., 2007; Oliveira et al., 2018). Foi aplicado 1J de energia por ponto, totalizando 4J de energia por sessão e 16 J em todo tratamento do grupo IRL4 e 28J em todo o tratamento do grupo ILR7. A densidade de energia utilizada foi de aproximadamente, 35,33 J/cm<sup>2</sup>/ponto, 141,32 J/cm<sup>2</sup> por sessão; sendo assim, o grupo IRL4 utilizou um total de 485,28 J/cm<sup>2</sup> de energia em todo o tratamento, enquanto que no grupo IRL7 aplicou um total de 989,24 J/cm<sup>2</sup> de energia em todo o tratamento.

### ***Microtomografia ( $\mu$ CT)***

Depois dos períodos de 30 e 90 dias, os animais foram eutanasiados administrando uma injeção intraperitoneal de 150mg/kg de Tiopental associado à Lidocaína 10mg/kg. Para o escaneamento das amostras dos ramos de mandíbula, foi utilizado o aparelho Skyscan (SkyScan, Kontich, Bélgica) com os seguintes parâmetros de: pixel da câmera: 12.45; potência do tubo de raio x: 65 kVP, x-ray intensity: 385  $\mu$ A, tempo de integração: 300 ms, filtro: Al-1 mm, e tamanho do voxel: 18  $\mu$ m<sup>3</sup>. As imagens formadas foram posteriormente reconstruídas, reorientadas espacialmente e analisadas por meio de softwares específicos (NRecon/DataViewer/CTan, Skyscan, Aartselaar, Belgium). O volume de tecidos mineralizados foi analisado dentro de uma região de interesse (ROI), cuja área de interesse envolveu todo o tecido formado entre a cápsula e a face lateral do ramo da mandíbula. Foi utilizado um threshold na faixa de 65-250 de tons de cinza para avaliar o volume de tecido mineralizado dentro da ROI. Também foram avaliados os seguintes padrões de microestrutura do tecido formado: Espessura das trabéculas (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N) e espaço entre as trabéculas (Tb.Sp).

### ***Análise histomorfométrica***

Depois de ter sido feita a análise por  $\mu$ CT, as amostras foram descalcificadas em EDTA 7% e submetidas ao processamento laboratorial para serem incluídas em parafina. As amostras foram seccionadas em sua região central e inclusas no plano transversal. Foram realizados, em seguida, cortes seriados com espessura de 5 $\mu$ m obtendo 3 lâminas com 3 cortes cada, que foram coradas em hematoxilina-eosina (HE). Foram escolhidos 3 cortes com 20  $\mu$ m de equidistância,

sendo o primeiro selecionado de maneira randômica. As imagens histológicas foram capturadas utilizando um scanner de lâminas histológicas (Scanscope AT, Aperio Technologies, Inc. Irvine, CA, EUA), com aumento de 200x. As mensurações histomorfométricas foram realizadas por meio de um software analisador de imagens (Scanscope AT Image Scope, Aperio Technologies, Inc. Irvine, CA, EAU). Foi determinada a porcentagem de osso e de biomaterial no espaço entre o domo e a face lateral do ramo da mandíbula.

### ***Tamanho da amostra***

O cálculo de amostra foi executado tendo como base a análise histomorfométrica que verifica a quantidade de tecido ósseo formado na ROI, variável primária desse estudo. Para tanto, foram utilizados os dados histomorfométricos do estudo de Oliveira et al. 2018, que utilizou um modelo experimental semelhante ao que foi proposto nesse estudo e avaliou o efeito da PBMT com laser infravermelho sobre a integração de biomateriais osteocondutores. Foi verificado nesse estudo que a diferença entre as médias de porcentagem de osso neoformado na área enxertadas com osso bovino desproteínizado entre os grupos controle e PBMT foi de 13.80, com desvio padrão médio de 5.65. Ao se fixar o poder  $\beta$  do estudo de 0.85 e o poder  $\alpha$  de 0.05 foi determinado que o tamanho mínimo de amostra deveria ser de 6 animais por grupo e período experimental.

### ***Análise estatística***

O software Graphpad Prism 8.0 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para análise estatística desse estudo. Os dados numéricos desse estudo foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e se comportaram de acordo com o teorema da distribuição normal. Devido a isso, foi aplicado o teste Two-way ANOVA, complementado pelo teste de Tukey para análise inferencial dos dados levando-se em consideração os diferentes tratamentos (CTR, IRL4, IRL7) e o períodos de avaliação (30 e 90 dias). Todos os testes estatísticos foram aplicados com nível de confiança de 95%.

## RESULTADOS

Dois animais não resistiram ao procedimento cirúrgico (Um do grupo CTR e outro do grupo IRL7, período de 30d.). Um animal do grupo CTR do período de 90d morreu durante o acompanhamento. Esses animais foram repostos para evitar reduzir perda do poder estatístico desse estudo. Todos os outros animais resistiram aos experimentos e foram utilizados para análise final dos dados.

### *A aplicação da PBMT alterou o volume e a microestrutura do tecido enxertado*

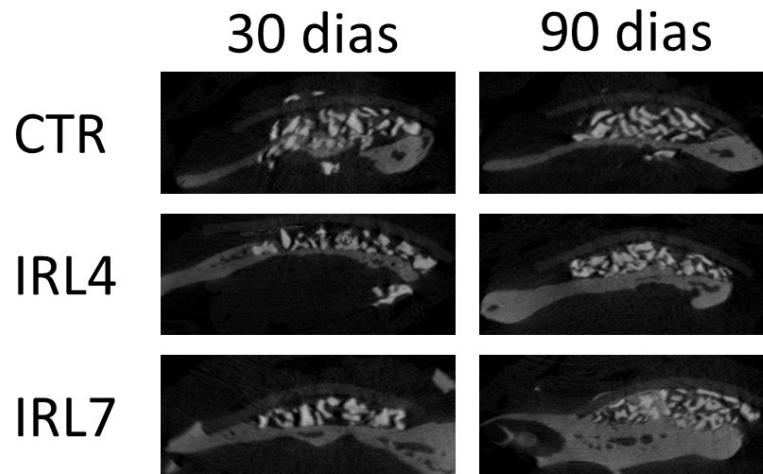
Foi observado por meio da análise microtomográfica que as áreas enxertadas com OBD que não foram irradiadas apresentaram maiores volumes de tecidos mineralizados em ambos os períodos de avaliação (exceção com o grupo IRL4 aos 30 dias) ( $p<0.05$ ) (Figura 2), maior número de trabéculas (Tb.N) que os outros grupos em ambos os períodos de avaliação ( $p<0.05$ ) e menores valores de espaço entre as trabéculas (Tb.Sp) que ambos os grupos tratados com IRL no período de 90 dias ( $p<0.05$ ). Os dados da análise microtomográfica estão expostos na tabela 1.

Tabela 1: Dados de média e desvio padrão dos dados de microestrutura óssea avaliada por análise microtomográfica.

Período	Grupos	BV/TV	Tb.Th	Tb.N	Tb.Sp
30d	CTR	56.93±14.23 <sup>a</sup>	14.01±2.57	0.040±0.004 <sup>a</sup>	13.49±3.21
	IRL4	44.05±1.28 <sup>a,b</sup>	12.83±0.91	0.034±0.003 <sup>b</sup>	16.05±2.97
	IRL7	40.96±4.43 <sup>b</sup>	13.35±0.76	0.030±0.001 <sup>b</sup>	17.32±2.99
90d	CTR	70.70±5.60 <sup>a</sup>	16.59±3.16	0.045±0.004 <sup>a</sup>	9.47±1.29 <sup>aδ</sup>
	IRL4	58.05±6.83 <sup>#b</sup>	16.34±1.54 <sup>#</sup>	0.035±0.002 <sup>b</sup>	13.50±0.85 <sup>b</sup>
	IRL7	51.02±6.96 <sup>#b</sup>	15.72±0.48 <sup>#</sup>	0.032±0.004 <sup>b</sup>	16.39±3.08 <sup>b</sup>

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos –  $p<0.05$  One-way Anova complementado pelo teste de Tukey; #Maiores valores que o mesmo grupo no período de 30 dias – Teste t-não pareado; <sup>δ</sup> #Maiores valores que o mesmo grupo no período de 30 dias – Teste t-não pareado

**Figura 2:** Imagens representativas obtidas por microtomografia onde é possível notar maior volume de tecido enxertado no grupo CTR.



***A aplicação da PBMT acelerou a formação óssea em áreas enxertadas independentemente da quantidade de sessões de irradiação***

Foi observado por meio da análise histomorfométrica que as áreas tratadas com IRL apresentaram maiores quantidade de osso do que as áreas enxertadas não irradiadas no período de 30 dias ( $p < 0.05$ ). No período de 30 dias também foi observado uma maior quantidade de tecidos moles em áreas enxertadas não irradiadas ( $p < 0.05$ ) (Figura 3). Essas diferenças não foram observadas no período de 90 dias, provavelmente influenciada pelo aumento da formação óssea observado no grupo CTR em relação ao observado no período de 30 dias ( $p < 0.05$ ). Os dados da análise histomorfométrica estão expostos na tabela 2.

Tabela 2: Dados de média e desvio padrão dos dados da composição das áreas enxertadas que foram avaliadas por meio de análise histomorfométrica.

Período	Grupos	%Osso	% Substituto ósseo	%Tecido mole
30d	CTR	6.38±2.42 <sup>b</sup>	29.99±7.00	63.62±8.78 <sup>a</sup>
	IRL4	11.76±4.82 <sup>a,b</sup>	33.97±7.89	54.27±3.93 <sup>b</sup>
	IRL7	12.93±4.88 <sup>a</sup>	33.55±1.85	53.52±4.03 <sup>b</sup>
90d	CTR	10.15±3.64 <sup>#</sup>	32.40±3.60	57.45±5.92
	IRL4	14.58±4.04	33.59±8.15	51.83±4.65

IRL7

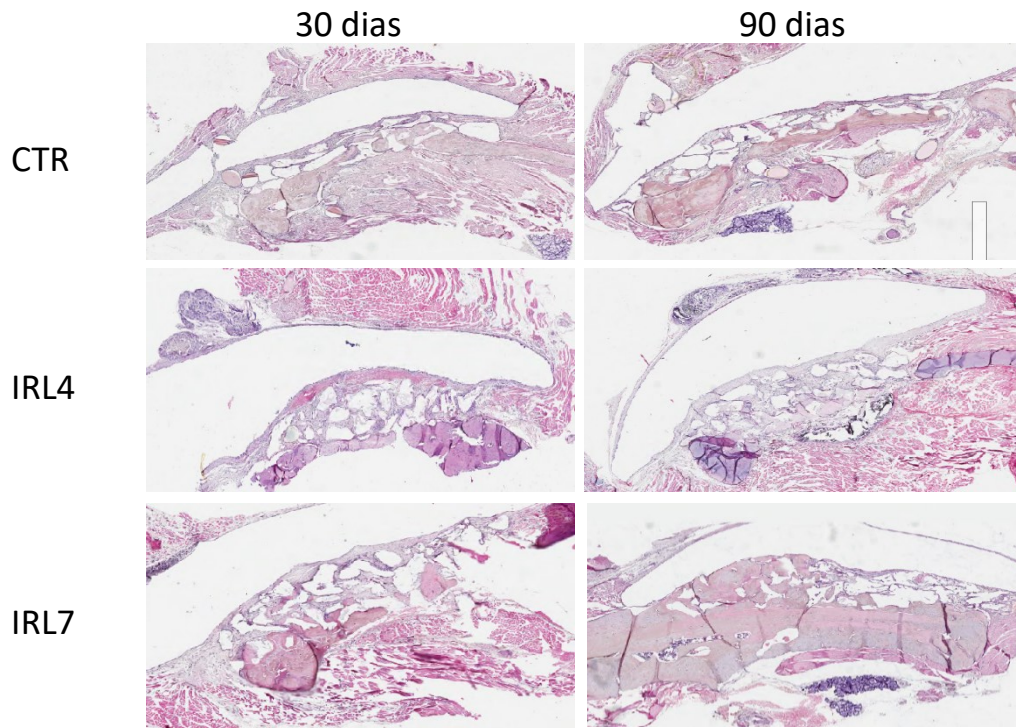
16.09±6.61

36.98±7.53

46.93±10.74

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos –  $p < 0.05$  One-way Anova complementado pelo teste de Tukey; #Maiores valores que o mesmo grupo no período de 30 dias – Teste t-não pareado.

**Figura 3:** Imagens representativas da análise histomorfométrica. É possível notar uma maior quantidade de osso nos grupos IRL do que no grupo CTR. (Aumento 25x – Coloração HE)



## DISCUSSÃO

De uma forma geral foi notado que a PBMT com IRL alterou o processo de reparo em áreas enxertadas com OBD aumentando a quantidade de osso neoformado associado a redução do volume da área enxertada. Esse efeito foi observado nos grupos irradiados independentemente da quantidade de sessões aplicadas. Dessa forma, a hipótese nula desse trabalho foi rejeitada.

A análise microtomográfica demonstrou que a PBMT com IRL alterou o volume e a microestrutura da área enxertada produzindo redução do volume e da espessura das trabéculas e aumento do espaço entre as trabéculas ósseas. A redução volumétrica observada nos grupos IRL pode estar associada ao aumento da produção de mediadores biológicos que estimulam a diferenciação, proliferação e ação osteoblástica (eg. BMP2, Runx2, Fosfatase alcalina) (PINHEIRO ET AL., 2017; OLIVEIRA ET AL., 2018). Consequentemente, as áreas irradiadas sofreram um processo de remodelação tecidual maior, diminuindo o volume dos tecidos mineralizados. De fato, enxertos com maior potencial biológico para formação óssea apresentam maiores reduções volumétricas tais como observados em áreas enxertadas com osso autógeno (SHANBHAG; STAVROPOULOS, 2014) ou em defeitos cicatrizados espontaneamente preenchidos com coágulo sanguíneo (RIGNON-BRET ET AL., 2022). Assim como observado nesse estudo, terapias que visam melhorar o potencial osteogênico e osteoindutor do OBD também estão associados a redução volumétrica de áreas enxertadas, apesar da maior formação óssea, tais como observados na associação desse material com o enxerto de osso autógeno (RIGNON-BRET ET AL., 2022). Dessa forma, ao se aplicar a PBMT é provável que maiores quantidades de substituto ósseo devem ser utilizadas para evitar que essa redução volumétrica prejudique o planejamento para instalação de implantes em áreas enxertadas com OBD.

A menor quantidade de trabéculas e o aumento de espaço entre as mesmas observadas no grupo IRL pode também estar associado ao aumento do processo de remodelação de resultou na redução volumétrica das áreas enxertadas com o OBD. Esse espaço criado pode ter sido importante para maior formação óssea observada nos grupos IRL em comparação ao grupo CTR, pois a presença de partículas de material está relacionada a menor formação óssea em áreas enxertadas com OBD (CARMAGNOLA; ADRIAENS; BERGLUNDH, 2003). Adicionalmente a isso, a dificuldade da análise microtomográfica em identificar osso neoformado ao redor de partículas de materiais opacos pode ter interferido nesse resultado, pois, sabe-se que a estrutura óssea em áreas enxertadas tem baixa correlação com o que é

observado histologicamente (LIMA ET AL., 2022), dessa forma, é possível que os achados microestruturais observados estejam relacionados com alterações na estrutura do OBD.

A PBMT com IRL promoveu aumento da formação de tecido ósseo com redução da quantidade de tecido mole comparado ao grupo CTR. Esse perfil de composição da biópsia pode influenciar no processo de osseointegração tal como observado em outros estudos pré-clínicos que demonstraram que a PBMT com laser IRL melhora o processo de osseointegração de implantes sem tratamento de superfície instalados em áreas enxertadas com OBD (DE OLIVEIRA ET AL., 2020; DE OLIVEIRA ET AL., 2021). No entanto, esse efeito benéfico no reparo tecidual foi observado nesse estudo com um número reduzido de sessões o que leva a geração da hipótese de que 4 sessões com o IRL poderiam ser suficientes para beneficiar o processo de osseointegração, entretanto, essa hipótese necessita ser testada futuramente.

Um fato importante observado nesse estudo foi a discrepância dos resultados de formação óssea em relação a outro estudo pré-clínico conduzido por nosso grupo de pesquisa onde a aplicação da PBMT com IRL promoveu maior formação de tecido ósseo no período de 90 dias em áreas enxertadas com OBD (DE OLIVEIRA ET AL., 2018), fato esse não observado nesse estudo. Os substitutos de tecido ósseo testados, apesar de serem da mesma origem, são manufaturados de forma distintas. O OBD utilizado no estudo de Oliveira et al., 2018 é manufaturado por desproteíntização a baixa temperatura enquanto que o OBD desse estudo é sinterizado a altas temperaturas, o que altera o grau de cristalinidade e de liberação de cálcio. O OBD desproteíntizado a baixas temperaturas libera mais cálcio e apresenta um potencial de formação óssea melhor que o OBD sinterizado a altas temperaturas (RIACHI ET AL., 2012), o que pode explicar os resultados mais promissores no período de 90 dias da PBMT observados com esse material. A comparação da PBMT com IRL nesses diferentes tipos de OBD será necessária para testar essa hipótese.

A equivalência dos resultados observados da PBMT aplicada em 4 ou 7 sessões propõe uma redução importante a necessidade de visitas que os pacientes necessitarão ser submetidos para obter um efeito positivo com esse tipo de intervenção. A redução dessa necessidade de retornos para sessões de PBMT com IRL aumenta a possibilidade de adesão do paciente a esse tratamento e podem tornar os resultados das técnicas de enxertia com OBD mais previsíveis. Entretanto, vale salientar que esse estudo apresenta limitações com relação ao material utilizado, pois os efeitos da PBMT com IRL em áreas enxertadas com OBD podem não serem os mesmo de áreas enxertadas com outros tipos de materiais. Outra limitação desse estudo é não ter comparado o enxerto ósseo utilizado (Cerabone) com outros materiais de enxerto que

já têm estudo como o Bio-Oss. Além disso, o estudo mostra que, para ter um resultado satisfatório, o protocolo se mostra um tanto quanto caro e, por vezes, inacessível a grande parte da população.

## **CONCLUSÃO**

A PBMT melhora o reparo tecidual em áreas enxertadas tanto em 4 como em 7 sessões. Entretanto, a aplicação da PBMT em 7 sessões é mais benéfica na formação óssea em comparação às áreas enxertadas não irradiadas.

## REFERÊNCIAS

CARMAGNOLA, Daniela; ADRIAENS, Patrick; BERGLUNDH, Tord. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss®. *Clinical oral implants research*, v. 14, n. 2, p. 137-143, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2003.140201.x>

CHAVDA, Suraj; LEVIN, Liran. Human studies of vertical and horizontal alveolar ridge augmentation comparing different types of bone graft materials: a systematic review. **Journal of Oral Implantology**, v. 44, n. 1, p. 74-84, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-17-00053>

DE MIRANDA, Jamilly Rodrigues et al. Histologic Evaluation of Early Bone Regeneration Treated with Simvastatin Associated with Low-Level Laser Therapy. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 34, n. 3, 2019. DOI: <https://doi.org/10.11607/jomi.6990>

DE OLIVEIRA, Guilherme JPL et al. Effect of low-level laser therapy on the healing of sites grafted with coagulum, deproteinized bovine bone, and biphasic ceramic made of hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate. In vivo study in rats. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 50, n. 6, p. 651-660, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/lsm.22787>

DE OLIVEIRA, Guilherme José Pimentel Lopes et al. Low-level laser therapy (LLLT) in sites grafted with osteoconductive bone substitutes improves osseointegration. **Lasers in Medical Science**, v. 35, p. 1519-1529, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02943-w>

DE OLIVEIRA, Guilherme José Pimentel Lopes de et al. Effect of different low-level intensity laser therapy (LLLT) irradiation protocols on the osseointegration of implants

placed in grafted areas. **Journal of Applied Oral Science**, v. 29, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2020-0647>

GABBAI, Armelin et al. Association of bioglass/collagen/magnesium composites and low level irradiation: effects on bone healing in a model of tibial defect in rats. **Laser therapy**, v. 27, n. 4, p. 271-282, 2018. DOI: [https://doi.org/10.5978/islsm.27\\_18-OR-25](https://doi.org/10.5978/islsm.27_18-OR-25)

GUIDA, Luigi et al. 6-mm-short and 11-mm-long implants compared in the full-arch rehabilitation of the edentulous mandible: A 3-year multicenter randomized controlled trial. **Clinical Oral Implants Research**, v. 31, n. 1, p. 64-73, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/clr.13547>

GULINELLI, J. L. et al. Maxilla reconstruction with autogenous bone block grafts: computed tomography evaluation and implant survival in a 5-year retrospective study. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 46, n. 8, p. 1045-1051, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2017.03.019>

HUH, Jung-Bo et al. Effect of rhBMP-2 immobilized anorganic bovine bone matrix on bone regeneration. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 7, p. 16034-16052, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms160716034>

JAKSE, Norbert et al. Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation: An experimental study on sheep. **Clinical oral implants research**, v. 18, n. 4, p. 517-524, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2007.01369.x>

JENSEN, Thomas et al. Bone-to-implant contact after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios in mini pigs. **Clinical Oral Implants Research**, v. 24, n. 6, p. 635-644, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02438.x>

KIM, Hyun-Suk et al. Evaluation of bone healing using rhBMP-2 soaked hydroxyapatite in ridge augmentation: A prospective observational study. **Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 39, n. 1, p. 1-6, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40902-017-0138-9>

LIMA, Julia Raulino et al. Effect of different thresholds on the accuracy of linear and volumetric analysis of native-and grafted-bone. **Brazilian Dental Journal**, v. 33, p. 40-46, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-6440202204823>

MEIJNDERT, L. et al. Bone quality at the implant site after reconstruction of a local defect of the maxillary anterior ridge with chin bone or deproteinised cancellous bovine bone. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 34, n. 8, p. 877-884, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2005.04.017>

PIGNATON, Túlio Bonna et al. Influence of residual bone height and sinus width on the outcome of maxillary sinus bone augmentation using anorganic bovine bone. **Clinical Oral Implants Research**, v. 30, n. 4, p. 315-323, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/clr.13417>

PINHEIRO, Antônio Luiz Barbosa et al. Biochemical changes on 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 in medical science**, v. 32, n. 3, p. 663-672, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2165-2>

QUIROZ, Victor F. et al. Comparison of osseointegration in areas grafted with deproteinized bovine bone and native bone. A preclinical study. **Acta Odontológica Latinoamericana**, v. 35, n. 1, p. 3-9, 2022. DOI: <https://doi.org/10.54589/aol.35/1/3>

RIACHI, Fawzi et al. Influence of material properties on rate of resorption of two bone graft materials after sinus lift using radiographic assessment. **International journal of dentistry**, v. 2012, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/737262>

RIGNON-BRET, Christophe et al. Radiographic evaluation of a bone substitute material in alveolar ridge preservation for maxillary removable immediate dentures: A randomized controlled trial. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 128, n. 5, p. 928-935, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2021.02.013>

SBORDONE, Carolina et al. Retrospective volume analysis of bone remodeling after tooth extraction with and without deproteinized bovine bone mineral insertion. **Clinical oral implants research**, v. 27, n. 9, p. 1152-1159, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/clr.12712>

SCHMITT, Christian Martin et al. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. **Clinical oral implants research**, v. 24, n. 5, p. 576-585, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02431.x>

SHANBHAG, Siddharth; SHANBHAG, Vivek; STAVROPOULOS, Andreas. Volume changes of maxillary sinus augmentations over time: a systematic review. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 29, n. 4, 2014. DOI: <https://doi.org/10.11607/jomi.3472>

SLAGTER, Kirsten W. et al. Immediate placement of single implants with or without immediate provisionalization in the maxillary aesthetic region: a 5-year comparative study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 48, n. 2, p. 272-283, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcpe.13398>

SPIN-NETO, R. et al. Pereira LAVD. Marcantonio E. Graft incorporation and implant osseointegration following the use of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts for lateral ridge augmentation. **Clin Oral Implants Res**, v. 25, p. 226-233, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/clr.12107>

STARCH-JENSEN, Thomas et al. Harvesting of autogenous bone graft from the ascending mandibular ramus compared with the chin region: a systematic review and meta-analysis focusing on complications and donor site morbidity. **Journal of oral & maxillofacial research**, v. 11, n. 3, 2020. DOI: <https://doi.org/10.5037/jomr.2020.11301>

URBAN, Istvan A. et al. Horizontal ridge augmentation with a collagen membrane and a combination of particulated autogenous bone and anorganic bovine bone-derived mineral: a prospective case series in 25 patients. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 33, n. 3, 2013. DOI: <https://doi.org/10.11607/prd.1407>

URBAN, Istvan A. et al. Long-term evaluation of peri-implant bone level after reconstruction of severely atrophic edentulous maxilla via vertical and horizontal guided bone regeneration in combination with sinus augmentation: a case series with 1 to 15 years of loading. **Clinical implant dentistry and related research**, v. 19, n. 1, p. 46-55, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/cid.12431>

**ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética de Utilização de Animais da Universidade  
Federal de Uberlândia**



Universidade Federal de Uberlândia  
Comissão de Ética na Utilização de Animais



**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado “Comparação de diferentes protocolos de irradiação do laser infravermelho sobre o reparo em áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado”, protocolo nº **035/20**, sob a responsabilidade de **Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **12 de março de 2021**.

(We certify that the project “Comparação de diferentes protocolos de irradiação do laser infravermelho sobre o reparo em áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado”, protocol **035/20**, under the responsibility of **Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was **approved** for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF

UBERLÂNDIA, in meeting of March 12th, 2021).

Vigência do Projeto	Início: 01/06/2021 Término: 31/05/2023
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Rato heterogênico Wistar
Número de animais	<b>56 animais</b>
Peso / Idade	3 meses/ 250 a 300g
Sexo	Macho
Origem / Local	REBIR - UFU
Local onde serão mantidos os animais:	REBIR - UFU

Uberlândia, 15 de Março de 2021.

  
**Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Comissão de Ética na Utilização de Animais  
Coordenador da CEUA