

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - MESTRADO
AREA DE CONCENTRAÇÃO: CLINICA INTEGRADA**

CINDY GRACE PEREZ PACHECO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO PROCESSO
DE REPARO DE ALVÉOLOS PÓS-EXODONTIA TRATADOS COM
HIDROXIAPATITA E OSSO BOVINO INORGÂNICO EM RATOS**

**PONTA GROSSA
2016**

CINDY GRACE PEREZ PACHECO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO
PROCESSO DE REPARO DE ALVÉOLOS PÓS-EXODONTIA
TRATADOS COM HIDROXIAPATITA E OSSO BOVINO INORGÂNICO
EM RATOS**

Dissertação para obtenção do título de Mestre na
Universidade Estadual de Ponta Grossa - Área de
Clínica Integrada. Linha de Pesquisa: Etiologia,
Diagnóstico e Tratamento das Doenças Bucais.

Orientadora: Profa. Dra. Shelon Cristina Souza Bandeca

Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Eduardo Klüppel

PONTA GROSSA

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Facheco, Cindy Grace Perez
P116 Avaliação do efeito do laser de baixa intensidade no processo de reparo de alvéolos pós-exodontia tratados com hidroxiapatita e osso bovino inorgânico em ratos/ Cindy Grace Perez Facheco. Ponta Grossa, 2016.
79f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia - Área de Concentração: Clínica Integrada), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientadora: Profª Drª Shelon Cristina Souza Bandeca.
Coorientador: Prof. Dr. Leandro Eduardo Klüppel.

1.Alvéolo dental. 2.Regeneração óssea. 3.Substitutos ósseos. 4.Terapia laser de baixa intensidade. I.Bandeca, Shelon Cristina Souza. II. Klüppel, Leandro Eduardo. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Odontologia. IV. T.

CDD: 617.6

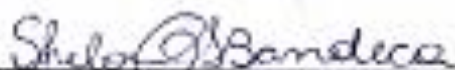
TERMO DE APROVAÇÃO

CINDY GRACE PÉREZ PACHECHO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO PROCESSO
DE REPARO DE ALVÉOLOS PÓS-EXODONTIA TRATADOS COM
HIDROXIAPATITA E OSSO BOVINO INORGÂNICO EM RATOS**

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Mestre na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia –
Área de Concentração em Clínica Integrada.

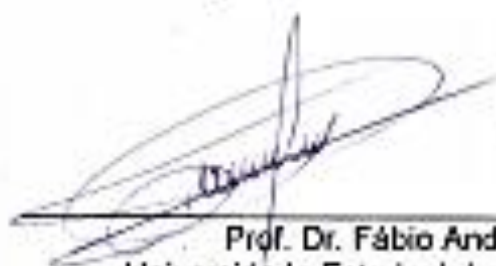
Ponta Grossa, 19 de fevereiro de 2016



Prof. Dr. Shelon Cristina de Souza Bandeca - Orientadora
Universidade Estadual de Ponta Grossa/UEPG



Prof. Dr. Silvia Cristina Nunez
Universidade de São Paulo/USP



Prof. Dr. Fábio André dos Santos
Universidade Estadual de Ponta Grossa/UEPG

Dedicatória

A meu filho, Gabriel
Pelo amor e apoio que sempre
tem me dado.

AGRADECIMENTOS

À prof^a Dra. Shelon Cristina Souza Bandeca, minha orientadora, por assumir o reto de me guiar nesta fase. Obrigada pelo carinho, atenção e paciência!

Ao prof. Dr. Leandro Kluppel pela orientação e ajuda no delineamento do trabalho.

À prof^a Dra. Marcela Claudino pelos ensinamentos e pela paciência, mas sobretudo, pela confiança, amizade e apoio que me deu, não só nos assuntos acadêmicos, fico muito grata!

Ao prof. Dr. Eduardo Bauml Campagnoli pela boa disposição sempre, seu apoio foi enorme e fundamental na realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Fábio André dos Santos pela dedicação e coordenação do Laboratório de Histopatologia e Biologia Celular da pós-graduação, porque sempre obtive uma resposta dada com muita vontade.

Enfim, a todos os professores da pós-graduação que sempre estiveram dispostos em dividir conhecimentos e sorrisos, levo todos vocês no meu coração.

Ao Luiz Roberto Canteri, técnico do Laboratório de Histopatologia e Biologia Celular da pós-graduação, pela ajuda no processamento laboratorial.

À Morgana das Graças, secretária da pós-graduação, por todas as orientações administrativas durante todo este tempo.

À Leticia Campos, aluna do doutorado, por sempre compartilhar conhecimentos, me ajudar e me treinar pessoalmente no manejo dos animais.

A Paula Francine, aluna da graduação, pela disposição e ajuda na fase final do trabalho. Obrigada por me aliviar muitas vezes!!!

Aos funcionários da UEPG, pela ajuda, sorrisos, conversas e palavras de animo que amenizaram também esta fase.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa do mestrado.

E não posso deixar de agradecer às pessoas que me deram suporte e me apoiaram nesta caminhada, sem elas não tivesse sido possível escrever estas linhas agora.....

A minha família inteira, dirigida por Martha Pacheco Urquizo e Hugo Perez Zegarra, pelo apoio incondicional e porque compreendi o que significa a felicidade crescendo e dividindo a vida com vocês.

Ao Gabriel Hermoza Perez, meu filho, pela enorme paciência e por torcer por

mim sempre.

A Luisa Alegria, Ana López, Mariane Sanson, Gisele Dias, Kaori Ouba, Janete Tavares, Sibelli Parreiras, Driellen Zarpellon, Benjamin Muñoz, Pailover Bermudez, Felipe Gutierrez, Gabriel Coutinho... obrigada pela amizade e cumplicidade, por sempre estar ai para mim e por ser os tios queridos do Gabriel... minha total gratidão com vocês!

A toda minha turma do mestrado e amigos do doutorado pela parceria, pelas boas conversas e porque sempre me senti bem acolhida ainda quando não conhecia ninguém ao começar esta aventura.

E finalmente, obrigada Deus por me permitir conhecer-te e reconhecer mais uma vez que Você é o fator constante da minha vida, por deixar acontecer o que é preciso, por colocar as pessoas necessárias nos momentos certos e por me ensinar a desfrutar a simplicidade na vida.

Por fim, a todos os que direta e indiretamente fizeram parte deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!!

RESUMO

PEREZ C.G.P. Avaliação do efeito do laser de baixa intensidade no processo de reparo de alvéolos pós-exodontia tratados com hidroxiapatita e osso bovino inorgânico em ratos. [Dissertação – Mestrado em Odontologia – Área de Concentração Clínica Integrada–Faculdade de Odontologia] Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2016

Os biomateriais e a fotobioengenharia são técnicas usadas com o intuito de melhorar o reparo ósseo e prevenir a reabsorção dos alvéolos após exodontia. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da Terapia de Laser de Baixa Intensidade (TLBI) comparativamente ao processo de reparo ósseo pós-exodontia em alvéolos de ratos tratados com hidroxiapatita + β -fosfato tricálcico (HA) e osso bovino inorgânico (OB). Foram utilizados 48 ratos machos divididos em seis grupos e subdivididos de acordo com o tempo de sacrifício (7 e 14 dias). C: coágulo, CL: Coágulo + TLBI, OB: osso bovino inorgânico, OBL: osso bovino inorgânico + TLBI, HA: hidroxiapatita + β -fosfato tricálcico e HAL: hidroxiapatita + β -fosfato tricálcico + TLBI. A TLBI (GaAIIAs, λ 780nm, 10mW, \varnothing 0,4cm, 75J/cm², 300s) foi aplicada no alvéolo imediatamente após exodontia, no dia seguinte, no terceiro e quinto dia após exodontia. Após 7 e 14 dias, 4 animais por grupos foram sacrificados. As amostras foram processadas e coradas com H-E para análise histológica e histomorfométrica. Aos 7 dias, encontrou-se uma maior quantidade de vasos sanguíneos em todos os grupos irradiados; e um maior número de osteoblastos mas somente houve diferença significativa entre os grupos CL7 (coágulo + TLBI) e OB7 (osso bovino inorgânico). Aos 14 dias, observou-se novamente mais vasos sanguíneos nos grupos irradiados; como também, maior presença de matriz óssea; porém, não estatisticamente significantes. Com o protocolo usado no presente estudo concluímos que a TLBI mostrou uma tendência na estimulação na fase inicial do reparo ósseo, sugerida pela maior proliferação celular osteoblástica e endotelial.

Palavras – chaves: Alvéolo Dental, Regeneração Óssea, Substitutos Ósseos, Terapia Laser de Baixa Intensidade

ABSTRACT

Biomaterials and the photobioengineering are techniques that emerged in order to enhance bone healing and prevent the reabsorption of sockets after the tooth extraction. The aim of this study was to evaluate the effect of low level laser therapy (LLLT) comparatively to the process of bone healing in post extraction sockets of rats treated with hydroxyapatite + β -tricalcium phosphate (HA) and inorganic bovine bone (IBB). Forty-eight male rats were divided into 6 groups and subdivided according to sacrifice time (7 and 14 days): C: clot, CL: Clot + LLLT, IBB: inorganic bovine bone, IBL: inorganic bovine bone + LLLT, HA: hydroxyapatite + β -tricalcium phosphate and HAL: hydroxyapatite + β -tricalcium phosphate + LLLT. The LLLT (GaAlAs, λ 780nm, 10mW, \varnothing 0,4cm, 75J/cm², 300s) was applied to the socket immediately after the extraction, the next day, in the third and fifth day. At 7 and 14 day, 4 animals per group were sacrificed. Samples were processed and stained with H-E for histological and histomorphometric analysis. At 7 day, greater presence of blood vessels was observed in all irradiated groups; as well as more quantity of osteoblasts but there was only statistically different between CL7 (clot + LLLT) and OB7 (inorganic bovine bone) groups. At 14 day, more blood vessels were counted in the irradiated groups; a greater presence of matrix bone was observed suggesting bone formation; however, without statistical difference. In the protocol used in this work, we conclude that LLLT had a tendency in the bioestimulation of the bone healing in its early phase based in the better proliferation of endothelial and osteoblastic cells.

Keywords: Dental Socket, Bone Regeneration, Bone Substitutes, Low Intensity Laser Therapy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1.** **A.**Técnica para segurar o rato. **B.** Aplicação de anestesia intraperitoneal.....34
- Figura 2.** Assepsia e antisepsia do campo operatório com solução de iodopovidone.....34
- Figura 3.** Colocação do campo estéril34
- Figura 4.** **A.** Sindesmotomia da gengiva marginal com o uso do periótomo. **B.** Luxação do incisivo. **C - D.** Avulsão do dente com pinça hemostática modificada. **E.** Incisivo superior direito. **F.** Aspecto clínico do alvéolo pós-exodontia.....35
- Figura 5.** **A.** Colocação do biomaterial. **B.** Preenchimento do biomaterial com cone de guta-percha. **C.** Alvéolo preenchido de biomaterial..... 36
- Figura 6.** Aplicação do laser de baixa intensidade.....36
- Figura 7.** Sutura de alvéolo com fio de seda 4.036
- Figura 8.** Fotomicrografia realizadas no FEG (Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo) **A.** Partícula de Clonus® sem triturar **B.** Partícula de Clonus® triturada **C.** Partícula de Bio-Oss® sem triturar **D.** Partícula de Bio-Oss® após trituração manual37
- Figura 9.** Obtenção da amostra.....40
- Figura 10.** Comprovação da descalcificação.....40
- Figura 11.** Vista da amostra descalcificada.....40
- Figura 12.** Vista oclusal superior e lateral da amostra reduzida.....41
- Figura 13.** **A.** Medição do comprimento do alvéolo **B.** Divisão em terços coronal, médio e apical41
- Figura 14.** Vista do corte transversal do terço médio.....41
- Figura 15.** Amostras marcadas com tinta nankin para facilitar a colocação no momento da inclusão.....41

Figura 16.	Colocação das amostras nos casquetes etiquetados para serem processadas no histotécnico.....	42
Figura 17.	Fotomicrografia do corte transversal do terço médio do alvéolo. A. Parede superior B. Parede inferior C. Parede externa D. Parede Interna E. Centro do alveolo (40X-HE).....	42
Figura 18.	Fotomicrografia do alvéolo com grade para análise histomorfométrica do software ImageJ (400X-HE).....	43
Figura 19.	Fotomicrografia do alvéolo com grade e contador de células para análise histomorfométrica do software ImageJ (400X-HE).....	43
Figura 20.	Fotomicrografias representativas da parede superior do alvéolo de todos os grupos aos 7 dias (400X-HE).....	47
Figura 21.	Fotomicrografias representativas da parede inferior do alvéolo de todos os grupos aos 7 dias (400X-HE).....	48
Figura 22.	Fotomicrografias representativas da parede externa do alvéolo de todos os grupos aos 7 dias (400X-HE).....	49
Figura 23.	Fotomicrografias representativas da parede interna do alvéolo de todos os grupos aos 7 dias (400X-HE).....	50
Figura 24.	Fotomicrografias representativas do centro do alvéolo de todos os grupos aos 7 dias (400X-HE).....	51
Figura 25.	Fotomicrografias representativas da parede superior do alvéolo de todos os grupos aos 14 dias (400X-HE).....	54
Figura 26.	Fotomicrografias representativas da parede inferior do alvéolo de todos os grupos aos 14 dias (400X-HE).....	55
Figura 27.	Fotomicrografias representativas da parede externa do alvéolo de todos os grupos aos 14 dias (400X-HE).....	56
Figura 28.	Fotomicrografias representativas da parede interna do alvéolo de todos os grupos aos 14 dias (400X-HE).....	57
Figura 29.	Fotomicrografias representativas do centro do alvéolo de todos os grupos aos 14 dias (400X-HE).....	58

GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Médias (%) da histomorfometria dos componentes do tecido ósseo neoformado dos grupos no período de 7 dias.....59
- Gráfico 2.** Médias (%) da histomorfometria dos componentes do tecido ósseo neoformado de todos os grupos no período de 14 dias....60
- Gráfico 3.** Médias (%) da histomorfometria dos componentes do tecido de granulação de todos os grupos no período de 7 dias.....61
- Gráfico 4.** Médias (%) da histomorfometria dos componentes do tecido de granulação de todos os grupos no período de 14 dias.....62

LISTA DE SIGLAS

β - TCP	β - Fosfato tricálcico
α - TCP	α - Fosfato tricálcico
AR	Aumento de rebordo
BCP	Biphasic Calcium Phosphate - Fosfato de cálcio bifásico
DBB	Desmineralized bovine bone - Osso bovino desmineralizado
EASM	Elevação do Assoalho do Seio Maxilar
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid - ácido etilenodiamino tetra-acético
GaAIs	Arseneto de gálio e alumínio
HA	Hidroxiapatita de cálcio
HE	Hematoxilina-eosina
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
pH	Potencial de hidrogenio
HA – β TCP	Hidroxiapatita e β -fosfato tricálcico
OBI	Osso Bovino Inórgânico
PDGF	Platelet-derived growth factor – Fator de crescimento derivado de plaquetas
TGF- β	Transformation growth factor beta – Fator de crescimento e transformação beta
TLBI	Terapia com Laser em Baixa Intensidade

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
±	Mais ou menos
®	Marca registrada (Brasil)
µm	Micrometro
cm	Centímetros
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
mm/min	Milímetro por minuto
mg/Kg	Miligrama por kilograma
ml/kg	Mililitro por kilograma
mW	miliWatt
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
°C	Graus Celsius
nm	Nanômetro

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1.	PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR	19
2.2.	BIOMATERIAIS	21
2.3.	TERAPIA LASER EM BAIXA INTENSIDADE (TLBI)	26
3.	OBJETIVOS	29
3.1.	OBJETIVO GERAL:	29
3.2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS:	29
4.	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1.	SUJEITO DA PESQUISA	30
4.1.1.	GRUPOS DA PESQUISA	30
4.2.	PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS	33
4.2.1.	MANEJO PRE-OPERATÓRIO	33
4.2.2.	MANEJO OPERATÓRIO	33
4.2.3.	MANEJO PÓS-OPERATÓRIO	38
4.2.4.	PROTOCOLO DE EUTANÁSIA	38
4.2.5.	COLETA E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA	38
4.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5.	RESULTADOS	45
5.1.	ANÁLISE HISTOLÓGICA	45
5.2.	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	59
5.2.1.	TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO	59
5.2.2.	TECIDO DE GRANULAÇÃO	61
6.	DISCUSSÃO	63
7.	CONCLUSÃO	67
8.	REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

A reabilitação oral é uma das grandes necessidades para a sociedade brasileira, sendo que um estudo epidemiológico revela a alta prevalência de pacientes edêntulos totais ou parciais no Brasil (Moreira et al.¹ 2005). Dentre as possibilidades protéticas de reabilitação para perda dos dentes estão as próteses fixas sobre estruturas dentárias remanescentes, próteses parciais removíveis e próteses totais. Entretanto, com estas opções, as exigências funcionais e estéticas dos pacientes podem não ser totalmente satisfeitas, pois as próteses removíveis podem apresentar desconforto devido sua possível mobilidade. Da mesma forma, as próteses fixas envolvem o preparo de elementos dentários adjacentes para atuarem como dentes de suporte. Assim, o uso de implantes dentários osseointegráveis como suporte para próteses fixas surgiu como uma alternativa que associa estética, funcionalidade e facilidade de adaptação para o paciente (Reich et al.² 2011).

No entanto, a disponibilidade de tecido ósseo é de fundamental importância para o sucesso do tratamento, sendo que a reabsorção óssea do rebordo favorecida pela ausência dos elementos dentários pode contra-indicar a instalação de implantes (Reich et al.² 2011).

Diversos estudos relatam a grande variação entre os indivíduos no grau de reabsorção do rebordo após a perda do dente (Amler et al.³ 1960; Atwood et al.⁴ 1962; Atwood et al.⁵ 1963; Johnson et al.⁶ 1963; Johnson et al.⁷ 1969; Carlsson et al.⁸ 1967; Pietrokovski e Massler et al.⁹ 1967; Schropp et al.¹⁰ 2003; Tan et al.¹¹ 2012). No sentido vertical, estudos mostram que a reabsorção óssea é de 1.24 ± 0.11 mm no aspecto lingual. Na região mesial, esta redução é de 0.84 ± 0.62 mm, enquanto a região distal apresentou valores de 0.80 ± 0.71 mm após seis meses da perda dentária (Lekovic et al.¹² 1997; Lekovic et al.¹³ 1998; Camargo et al.¹⁴ 2000; Serino et al.¹⁵ 2003; lasella et al.¹⁶ 2003; Pelegrine et al.¹⁷ 2010). No sentido horizontal, a reabsorção óssea variou entre 2.46 e 4.56mm, com valores médios de $3.79 \pm 0,23$ mm. Após 3 meses da exodontia, observou-se uma redução horizontal da ordem de 32%, sendo que, após seis meses, a reabsorção variou entre 29 e 63%. Assim, estes dados revelam uma perda de mais da metade do rebordo alveolar nos primeiros seis meses após exodontias (Lekovic et al.¹² 1997; Lekovic et al.¹³1998; Camargo et al.¹⁴ 2000; lasella et al.¹⁶ 2003; Pelegrine et al.¹⁷ 2010). Estas alterações nas dimensões do

rebordo podem representar um risco no resultado estético e comprometer a funcionalidade da reabilitação protética dos pacientes (Mc Allister et al.¹⁸ 2007).

Neste contexto, surgiram diversas técnicas de preservação do rebordo que consistem em tratar os alvéolos após à extração dental ou reconstruir os defeitos ósseos decorrentes de doença periodontal, traumas, sequelas cirúrgicas ou anomalias de desenvolvimento (Mc Allister et al.¹⁸ 2007; Esposito et al.¹⁹ 2009; Aloy-Prósper et al.²⁰ 2011; Horvath et al.²¹ 2013, Fukuoka et al.²² 2011).

Considerando os materiais de enxertia, o enxerto ósseo autógeno é o mais utilizado, sendo considerado como padrão ouro devido as suas vantagens biológicas e ao seu potencial osteogênico (Chen et al.²³ 2009). O osso autógeno é o único biomaterial que reúne propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras (Albrektsson et al.²⁴ 2001). Nos enxertos autógenos, o tecido ósseo é removido de uma área doadora do próprio paciente (crista ilíaca, mento, etc.) para ser implantado na área receptora, o que implica em duas intervenções cirúrgicas. Estes procedimentos estão associados a desvantagens como maior período de convalescência, morbidade e susceptibilidade a infecções no sítio doador e reabsorção progressiva e contínua (Chen et al.²³ 2009). Além disso, o alto potencial de reabsorção bem como a quantidade limitada devem ser considerados

Entretanto, outras alternativas incluem os enxertos heterógenos, xenógenos ou xenoenxertos, os quais são provenientes de outra espécie. É o caso do osso liofilizado de origem bovina, o qual é submetido a um processo de preparo que visa a eliminação de determinantes antigênicos (Weinfeld et al.²⁵ 1999).

Em humanos, foi observado menor percentual de reabsorção da tábua óssea vestibular em alvéolos pós-exodontia localizados na região anterior da maxila, os quais foram preenchidos com osso xenógeno liofilizado quando comparadas aos alvéolos que não receberam material de enxertia (Nevins et al.²⁶ 2006). Este achado foi confirmado em experimentos com animais, utilizando o modelo canino (Araújo e Lindhe et al.²⁷ 2011). Em um estudo realizado para avaliar a preservação do rebordo reconstruído com enxerto autógeno e xenógeno, nas regiões apical e média não foi observada reabsorção significativa. Porém, na região coronal, encontrou-se uma reabsorção de 25% nos alvéolos preenchidos com osso autógeno e um aumento de osso de 3.6% nos alvéolos preenchidos com osso xenógeno. O material residual representou 24,4% enquanto o osso não vital do enxerto autógeno foi 1,9%, estes dados sugerem que o enxerto autógeno não preserva o rebordo alveolar.

Os enxertos aloplásticos representam um grupo grande de biomateriais quimicamente diferentes à base de cálcio sintéticos, incluindo fosfato de cálcio, sulfato de cálcio, vidros bioativos e polímeros. Estes biomateriais variam em estrutura, composição química, propriedades mecânicas e biológicas. Além disso, não há restrição referente à quantidade disponível de enxerto e ao risco de transmissão de doenças.

Estes materiais vem sendo largamente utilizados na preservação do rebordo alveolar e elevação do assoalho do seio maxilar, apresentando elevados índices de sucesso. Neste contexto, o fosfato de cálcio bifásico (BCP) é um biomaterial aloplástico bifásico produzido por sinterização da hidroxiapatita (HA) e beta fosfato tricálcico (β -TCP). O objetivo de combinar estes dois materiais é que a HA mantenha o espaço enquanto o β -TCP pode reabsorver e promover a formação óssea (Wang e Lang et al.²⁸ 2012). Avaliações clínicas realizadas em humanos revelaram resultados promissores referentes a utilização deste biomaterial. Foram avaliados 45 alvéolos em 15 pacientes, os quais foram preenchidos com HA sintética enriquecida com magnésio e enxerto xenógeno (Crespi et al.²⁹ 2009). Após 4 meses, a deposição óssea foi detectada em todos os alvéolos bem como a ausência de células inflamatórias. No que se refere ao material residual, os alvéolos preenchidos com HA apresentaram índices residuais da ordem de 32%, sendo que os alvéolos preenchidos com osso xenógeno revelaram valores de 36%. Em relação ao osso vital, foram observados índices de 36% e 38% para HA e osso xenógeno, respectivamente. Desta forma, os autores concluíram que o comportamento biológico na formação e reabsorção óssea é similar para os dos tipos de biomateriais.

Desta forma, o uso de materiais de enxertia parece reduzir o processo de reabsorção alveolar na ausência de elementos dentários, tanto no aspecto vertical quanto no horizontal da crista óssea. Entretanto, a indicação do biomaterial a ser empregado permanece controversa (Vignoletti et al.³⁰ 2012).

Mas recentemente, estudos acharam outras alternativas para preservação de rebordo sem o uso de enxerto como o uso de terapia de laser de baixa intensidade (Fukuoka et al.²² 2011). Neste estudo em ratos, o osso foi avaliado histomorfometricamente aos 21 dias após exodontia e encontrou-se que a altura da crista alveolar foi maior no grupo irradiado (0.78 ± 0.01) que no grupo com alvéolos sem tratamento (0.65 ± 0.02) ($p < 0.05$). No tecido ósseo, o laser possui efeito bioestimulador sobre a proliferação dos osteoblastos (Trelles et al.³¹ 1987; Coombe et

al.³² 2001), sobre a produção de matriz óssea e sobre a maturação óssea por promover o aumento da fosfatase alcalina, das proteínas totais e dos níveis de cálcio em tecidos irradiados, além de aumentar a taxa de adesão celular em caso de enxertos e implantes. Para a reparação óssea, o efeito do aumento da angiogênese promovido pela irradiação com Terapia a Laser de Baixa Intensidade (TLBI) possibilita a formação de um osso mais vascularizado e, por isso, de melhor qualidade e menos propenso à infecções (Nicola et al.³³ 2003). O pós-operatório não é visto pelo profissional nem pelo paciente, por isso é importante conhecer os efeitos e, principalmente, os benefícios da irradiação laser no tecido ósseo para que a terapia possa ser utilizada.

O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente o efeito da terapia de laser de baixa intensidade no processo de reparo ósseo alveolar pós-exodontia em alvéolos tratados com osso bovino inorgânico ,e com hidroxiapatita e β fostato tricálcico em ratos após 7 e 14 dias.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR

O reparo do alvéolo dental tem sido largamente estudado em animais e humanos. Em cães (Cardaropoli et al. ³⁴ 2003; Araujo et al. ³⁵ 2005; Discepoli et al. ³⁶ 2013), ratos (Reis Filho et al. ³⁷ 2012), macacos (Scala et al. ³⁸ 2014), coelhos (Tamae et al. ³⁹ 2005), porco da índia (Johansen e Gilhuus-Moe ⁴⁰ 1969) e humanos (desde Amler et al. ³ 1960 até Barone et al. ⁴¹ 2014).

Imediatamente após a exodontia e dentro das primeiras 24 horas, o sangue dos vasos sanguíneos danificados preenchem completamente o alvéolo. As proteínas dos vasos e das células lesionadas formarão uma rede de fibrina que junto com as plaquetas darão origem ao coágulo, o qual servirá de tampão parando o sangramento. Um grande número de células mesenquimais, fibras e vasos sanguíneos do ligamento periodontal lesionado estão em contato direto com o coágulo neste momento. (Cardaropoli et al. ³⁴ 2003)

A partir do segundo ou terceiro dia inicia-se a destruição do coágulo, sendo que o tecido danificado e bactérias são então removidos pelos neutrófilos e macrófagos. A degranulação de plaquetas no coágulo libera moléculas sinalizadoras, tais como fator de crescimento derivado de plaquetas (platelet-derived growth factor - PDGF) e, fator de transformação de crescimento (transformation growth factor beta - TGF- β) que são importantes na regulação da migração, proliferação e diferenciação de células mesenquimais (Bolander et al. ⁴² 1992). Depois de terminar a limpeza da ferida, os neutrófilos morrem por apoptose (morte programada) e os macrófagos se retiram (Sato et al. ⁴³ 2007).

No alvéolo, as células mesenquimais e células semelhantes aos fibroblastos começam a proliferar e depositar os componentes da matriz no meio extracelular, este novo tecido substituirá, progressivamente, o coágulo por tecido de granulação. As fibras residuais do ligamento periodontal danificado, que são perpendiculares e estão inseridas no osso fascicular, guiam a formação da matriz extracelular composta de células mesenquimais, fibras colágenas e vasos sanguíneos em direção ao centro do alvéolo. A matriz substitui as fibras do ligamento periodontal, assim como os resíduos do coágulo e o tecido de granulação (Cardaropoli et al. ³⁴ 2003). A porção coronal do

alvéolo é coberto progressivamente por uma camada de tecido conjuntivo fibroso bem organizado, parcialmente revestido com células epiteliais.

A síntese e deposição de fibras de colágeno se antecipa à deposição de tecido mineralizado. Paralelamente, vários osteoclastos, que se encarregam do processo de remodelação do alvéolo, encontram-se nos espaços medulares dentro do osso fascicular, assim como nos canais de Volkmann (Trombelli et al. ⁴⁴ 2008).

A perda do ligamento periodontal e o osso fascicular ocorre paralelamente à deposição e mineralização da substância osteóide. As células osteoprogenitoras migram, concentrando-se ao redor dos vasos sanguíneos neoformados e se diferenciam em osteoblastos, os quais produzem uma matriz de proteínas colágenas (fibras colágenas) e não colágenas (proteoglicanos e glicoproteínas) formando a substância osteóide. Eventualmente os osteoblastos ficam aprisionados na matriz e transformam-se em osteócitos, ficando interconectados uns com os outros através dos prolongamentos citoplasmáticos (Lin et al. ⁴⁵ 1994).

A aposição mineral diminui a partir das regiões linguais até as bucais. Em várias áreas, a reabsorção do osso fascicular leva a uma comunicação entre os espaços da medula óssea do septo interdental e o osso primário recém formado no alvéolo. As trabéculas do osso primário se estendem desde as paredes do alvéolo ao centro do mesmo, e são muitas vezes associadas com a deposição de vasos sanguíneos neoformados. A formação de osso primário, progressivamente, diminui o espaço da matriz extracelular no alvéolo. Os osteoclastos estão presentes nas paredes do alvéolo até a superfície do osso lamelar da crista lateral do alvéolo, mas a atividade de reabsorção osteoclástica envolve também as trabéculas do osso primário neoformado indicando o início processo de modelação e remodelação óssea (Farina e Trombelli ⁴⁶ 2012).

Na parte superior do alvéolo forma-se uma ponte de tecido duro que o recobre, separando a mucosa dos tecidos contidos no alvéolo. Além disso, substitui-se a maior parte do osso primário na região apical por osso lamelar e medula óssea. A ponte marginal de tecido duro é reforçada por camadas de osso lamelar. Conjuntamente, as fibras de colágeno da mucosa de revestimento se inserem no osso cortical e, portanto, forma-se o perióstio. Nesta fase de cicatrização, existe uma grande quantidade de medula óssea bem organizada e trabéculas de osso lamelar (Farina e Trombelli ⁴⁶ 2012). Apenas após alguns meses acontecerá a remodelação total do tecido ósseo primário, tornando-se então tecido ósseo lamelar e medular. Nesta fase, a ferida está

cicatrizada, porém, os tecidos irão se adaptar às demandas funcionais, e neste caso ao não ter transmissão de forças pela mastigação sobre o osso, este vai ser reabsorvido.

Nos humanos, depois da extração dentária, nas primeiras 24 horas, o alvéolo se enche de sangue e ocorre a formação do coágulo. Na primeira semana, substitui-se o coágulo pelo tecido de granulação e o epitélio começa a proliferar para cobrir o tecido de granulação do alvéolo. Depois da primeira semana, o alvéolo contém tecido de granulação, também chamado de tecido conjuntivo jovem ou imaturo, e então inicia a deposição de tecido mineralizado (osteóide) na região apical (Amler et al. ³ 1960). Entre a segunda e quarta semana, ainda pode-se observar eritrócitos espalhados entre as células mesenquimais. O alvéolo está ocupado em 30% por tecido de granulação e em 50 % por tecido conjuntivo, que contém células mesenquimais, fibras colágenas e vasos sanguíneos (Trombelli et al. ⁴⁴ 2008). Entre a sexta e oitava semana, a maior parte do tecido de granulação é substituído por matriz extracelular e osso primário, e a parte marginal contém ilhas de osso primário ou imaturo (Amler et al. ³ 1960; Trombelli et al. ⁴⁴ 2008). Neste tempo a matriz extracelular representa 60 % e o osso primário 35 % e também predominam na fase final da cicatrização (12-24 semanas) enquanto o osso lamelar e medula óssea são menos frequentes. Além disso, a organização e arquitetura óssea não são completadas até a 24^a semana após a exodontia (Trombelli et al. ⁴⁴ 2008).

No processo de reparo ósseo estão envolvidos diversos fatores tanto locais quanto sistêmicos que podem alterá-lo, por isso este continua sendo objeto de estudo no intuito de facilitar a neoformação óssea para diminuir as sequelas da reabsorção que segue uma exodontia.

2.2. BIOMATERIAIS

A popularidade dos implantes dentais tem incrementado a demanda da preservação e reconstrução dentoalveolar, e juntamente, o desenvolvimento de diversos biomateriais no intuito de manter o volume do rebordo após a exodontia.

Os biomateriais são substâncias naturais ou sintéticas usadas na substituição de tecidos, e devem ter propriedades físicas, químicas e biológicas que favoreçam uma resposta adequada dos tecidos vivos (Guastaldi et al. ⁴⁷ 2010).

Existem diversos fatores envolvidos nos procedimentos de enxertia, incluindo tipo de material, local receptor, vascularidade, forças mecânicas transmitidas no local,

tamanho do poro do material, condições sistêmicas do paciente (Kao e Scott⁴⁸ 2007).

Os biomateriais podem ser classificados quanto à origem, propriedades biológicas, características físicas e reações biológicas.

Segundo à origem, podem ser sintéticos e naturais. Os sintéticos podem ser polímeros, metais, cerâmicas e compósitos. Os de origem natural podem ser ainda classificados em autógenos, quando o doador e receptor é o mesmo indivíduo; homogêneos ou alógenos, quando o doador e o receptor são da mesma espécie; xenógenos ou heterógenos, quando o material utilizado é de uma espécie diferente do receptor (Giannoudis et al.⁴⁹ 2005).

Segundo as propriedades biológicas, os biomateriais podem ser osteogênicos, quando as células osteoprogenitoras contidas no biomaterial conseguem sobreviver ao transplante, proliferar e diferenciar-se em osteoblastos para conseguir a neoformação óssea; osteoindutores, quando o biomaterial tem a capacidade de induzir as células mesenquimais indiferenciadas do leito receptor a se diferenciarem em osteoblastos, e osteocondutores, quando o biomaterial tem a capacidade de conduzir o desenvolvimento de novo tecido ósseo, este deve ser reabsorvido e simultaneamente substituído por osso, atuando como um arcabouço (Khan et al.⁵⁰ 2005; Sanada et al.⁵¹ 2003; LeGeros et al.⁵² 2002).

Segundo as características físicas, pode ser mineralizado, quando foram removidos os componentes orgânicos da matriz extracelular; desmineralizado, quando os componentes inorgânicos e celulares são removidos isolando só os componentes da matriz extracelular ou fresco quando o tecido não passa por nenhum tipo de processo. Segundo as reações biológicas pode ser biotolerado, quando o biomaterial implantado fica circunscrito por tecido conjuntivo fibroso; bioinerte, quando há um contato direto com o tecido ósseo, e bioativo, quando há uma interação do biomaterial e o tecido ósseo (Guastaldi et al.⁴⁷ 2010).

O biomaterial ideal deveria ser biocompatível, não alergênico, não tóxico e sem risco de transmissão de doenças; além disso, deve servir como arcabouço e ter uma taxa de degradação apropriada para permitir a formação óssea (Shirakata et al.⁵³ 2008).

O biomaterial autógeno é considerado o padrão ouro, pois possui todas as propriedades biológicas (Chen et al.²³ 2009; Aghaloo et al.⁵⁴ 2007; Albrektsson et al.²⁴ 2001). Porém, existem evidências clínicas que sugerem que os substitutos ósseos podem ser usados satisfatoriamente nos procedimentos de enxertia óssea (Al-Nawas

et al.⁵⁵ 2014; Nkenke et al.⁵⁶ 2009; Klein et al.⁵⁷ 2011; Kolk et al.⁵⁸ 2012).

Em meta-análise realizada por Al-Nawas et al. avaliaram a influência dos substitutos ósseos comparados com os enxertos autógenos em elevação do assoalho do seio maxilar (EASM) e aumento lateral e/ou vertical de rebordo (AR). Na EASM, a taxa de sucesso de implante foi $98,6\% \pm 2.6$ para os substitutos ósseos, $88.6\% \pm 4.1$ para os enxertos mistos de substitutos ósseos e autógenos, e $97.4\% \pm 2.2$ para os enxertos autógenos. No AR, a taxa de sucesso do implante foi $97.4\% \pm 2.5$ para os substitutos ósseos, $100\% \pm 0$ para os enxertos mistos de substitutos ósseos e autógenos, e $98.6\% \pm 2.9$ para os enxertos autógenos; não houve diferenças estatisticamente significativas. Este estudo conclui que a sobrevivência do implante parece ser independente do tipo do biomaterial usado nos procedimentos de ESM e AR (Al-Nawas et al.⁵⁵ 2014).

Por isso o desenvolvimento de biomaterial e sobretudo, do sintético, continua sendo de importância na preservação e regeneração óssea na cavidade bucal, pois oferece vantagens como disponibilidade das quantidades necessárias, evita a coleta de tecido autógeno ou o uso de biomaterial alógeno a partir de um banco de tecidos; reduz procedimentos clínicos e, portanto, o tempo clínico; diminui a ferida cirúrgica, evitando danos nervosos e vasculares, formação de hematoma ou desenvolvimento de um processo infeccioso, e facilita o pós-operatório (Rogers et al.⁵⁹ 2012; Aitasalo et al.⁶⁰ 2007).

Um dos biomateriais amplamente estudado é o Bio-Oss®, um enxerto xenógeno de osso bovino inorgânico que consiste de osso bovino cortical e esponjoso em forma de partículas (0,25mm-1mm e 1-2 mm) (Tadjoedin et al.⁶¹2003) de alta porosidade (600 a 1000 μ m) e tem se visto nas análises histológicas que as partículas do material residual estavam circundadas por osso neoformado (Barone et al.⁶² 2005; Orsini et al.⁶³ 2006).

Estudos demonstram achados positivos com este biomaterial tanto em humanos (Zitzmann et al.⁶⁴ 2001; Barone et al.⁶⁵ 2008) quanto em animais (Berglundh e Lindhe⁶⁶ 1997; Hammerle et al.⁶⁷ 1998). Na odontologia vem sendo utilizado junto com diversas técnicas como EASM, preservação e aumento de reborde alveolar, defeitos ósseos periodontais e associado à colocação de implantes (Lindhe et al.⁶⁸ 2013; Araujo e Lindhe et al.²⁷ 2011; Schmitt et al.⁶⁹ 2012)

Barone et al. 2008, avaliou clínica e histomorfométricamente os câmbios dimensionais dos alvéolos pós-exodontia tratados com osso bovino comparados com

os que não tiveram tratamento em quarenta pacientes com necessidade de exodontia e posterior colocação de implantes dentários. Observou-se maior reabsorção horizontal do rebordo no grupo submetido só à exodontia ($4,3 \pm 0.8$ mm) que no grupo tratado com o osso bovino (2.5 ± 1.2 mm); a redução vertical da parede bucal foi de 3.6 ± 1.5 mm para o grupo controle, enquanto no grupo no qual foi feita a preservação do alvéolo somente foi de $0,7 \pm 1.4$ mm. Além disso, na análise histomorfométrica, nos dois grupos se encontraram trabéculas ósseas mas no grupo da preservação do alvéolo estas apresentaram uma maior mineralização; a quantidade de tecido conjuntivo foi significativamente maior no grupo controle (Barone et al. ⁶⁵ 2008).

A estrutura mineral deste biomaterial é similar à do osso humano favorecendo suas propriedades osteoconductoras (Ohayon et al. ⁷⁰ 2011) convertendo-se assim em um biomaterial bem estudado e respaldado pela literatura. Porém, Traini et al encontraram falhas na reabsorção das partículas (Traini et al 2007 e 2008 ⁷¹⁻⁷²).

Dentro dos biomateriais sintéticos (cerâmicas), os fosfatos de cálcio são uns dos mais estudados na regeneração do tecido ósseo por terem uma composição similar ao osso, biocompatibilidade, bioatividade, taxas de degradação variáveis; osteocondutividade; alguns fosfatos cálcicos podem ser osteoindutores se tiverem a geometria tridimensional apropriada capaz de unir e concentrar proteínas ósseas morfogenéticas. Os dos fosfatos de cálcio mais conhecidos são a Hidroxiapatita (HA) e o fosfato tricálcico (TCP) (Shue et al. ⁷³ 2012).

A HA é um material biocompatível e osteocondutor, mas possui uma taxa lenta de biodegradação, a qual limita o uso clínico. Estudos tem mostrado que a HA começa a ser reabsorvida gradualmente após 4 a 5 anos de implantação. A reabsorção do material é uma característica desejada pois se espera uma formação concomitante do osso (Guastaldi et al. ⁴⁷ 2010; Kao e Scott ⁴⁸ 2007).

O TCP é um material que se caracteriza pela fácil dissolução no meio biológico, pois não é estável na presença de umidade ou fluidos. Há duas hipóteses para a degradação, uma é a dissolução pelos fluidos biológicos; e a outra sugere que a reabsorção deve-se à atividade osteoclástica sobre o biomaterial, já que em alguns estudos tem se observado células gigantes multinucleadas ao redor deste. O TCP tem quatro formas alotrópicas mas só duas (α -TCP e β -TCP) são usadas como biomateriais, apesar delas serem quimicamente idênticas, tem diferentes interações com o meio biológico, o β -TCP tem apresentado melhor bioatividade, osteocondutividade e biodegradação. (JX et al. ⁷⁴ 1998).

A combinação do β -TCP e a HA tem se tornado uma alternativa interessante, pois a HA serve como arcabouço mantendo o espaço enquanto o β -TCP se reabsorve e promove a neoformação óssea. O primeiro implante deste compósito foi realizado em 1986 com uma proporção HA: β -TCP de 20:80 (Wang e Lang ²⁸ 2012).

Bae et al. 2010, avaliaram clinicamente o uso de um compósito de HA: β -TCP (70:30) através da perda do volume do enxerto no EASM e da perda óssea periimplantar num período de acompanhamento de 13-30 (média 15) meses após a colocação da prótese sobre-implante. Observou-se que a taxa do sucesso do implante foi de 96 %; nenhum dos casos apresentou perda óssea peri-implantar > 1mm; e o volume do enxerto também não foi significativamente alterado, sendo a média da altura do osso pré-operatória de 4,64 mm, altura pós-operatória de 17,67 mm e após um ano de 16,78mm. Neste trabalho conclui-se que a perda do volume do enxerto não estava relacionada com a perda óssea peri-implantar e o material pode ser usado com segurança (Bae et al. ⁷⁵ 2010).

Covani et al. 2011, avaliaram a sobrevivência dos implantes dentários colocados posterior à EASM com compósito de HA: β -TCP (60:40) em pacientes com 12 meses de acompanhamento. A taxa de sucesso foi 92,5%, sugerindo que o uso do biomaterial é uma opção efetiva para a EASM (Covani et al. ⁷⁶ 2011).

De Coster et al. 2011, avaliaram histologicamente 15 alvéolos preenchidos com BCP e 10 alvéolos sem tratamento. No momento de colocação do implante e aproximadamente 22 semanas após tratamento foram tomadas as biópsias, podendo-se observar que a qualidade do osso nos alvéolos com BCP era menos densa. A análise histológica mostrou que 5 dos 15 alvéolos avaliados não tinham completado a cicatrização, no grupo controle se observou uma maior neoformação óssea. Neste estudo, o biomaterial interferiu no reparo ósseo normal (De Coster et al. ⁷⁷ 2011).

Lindgren et al 2012, avaliaram comparativamente um compósito de fosfato de cálcio bifásico (BCP) com osso bovino inorgânico (DBB) utilizados na EASM. Análises histológicas e histomorfométricas, taxa de sobrevivência, índices clínicos e exames radiográficos foram avaliados após três anos de carga funcional dos implantes. A área média de osso neoformado para o BCP foi 29% \pm 14.3% e 32% \pm 18% para DBB; a porcentagem de partículas em contato com o osso para o BCP foi 38% \pm 10.9% e 44% \pm 12.1% para DBB; a taxa de sobrevivência foi 96,8%. Conclui-se que o tipo de biomaterial não parece influenciar na taxa de sobrevivência dos implantes (Lindgren et al. ⁷⁸ 2012).

Mardas et al. 2010, avaliaram trinta pacientes distribuídos aleatoriamente em dois grupos, nos quais foram extraídos um dente não molar e preenchidos com BCP ou DBB, em todos os pacientes foi colocada uma membrana para cobrir os alvéolos. A redução do rebordo alveolar do grupo do BCP foi -1.1 mm e -2.1 mm para DBB. Ambos materiais preservaram o rebordo mas o BCP apresentou resultados clínicos mais favoráveis (Mardas et al.⁷⁹ 2010).

2.3. TERAPIA COM LASER EM BAIXA INTENSIDADE (TLBI)

A utilização de terapias baseadas na aplicação de fototerapia tem como objetivo fornecer energia luminosa para tecidos e células podendo assim ter efeito biomodulador sobre processos moleculares e bioquímicos que ocorrem normalmente nos tecidos. A absorção de energia proveniente do laser provoca a estimulação de moléculas e átomos das células, sendo que a utilização da radiação do laser com uma baixa intensidade evita os efeitos de aquecimento excessivo sobre os tecidos (Ebrahimi et al.⁸⁰ 2012).

Estudos apontam o efeito do laser na modulação de processos como a cicatrização de feridas e o reparo ósseo (Pinheiro; Brugnera e Zanin⁸¹ 2010). Em revisão da literatura a respeito da aplicação do laser de baixa potência no reparo ósseo, é clara a interferência do tratamento de modo a acelerar o processo de reparo em sítios de extração dental e defeitos de fraturas ósseas em modelos animais. Ebrahimi et al avaliaram literatura relevante (25 estudos), apesar de dois artigos demonstrarem dados contrastantes, onde a terapia laser em baixa intensidade provocou um atraso no processo de reparo ósseo ou nenhum efeito adicional, a maioria dos estudos aponta um efeito de otimização desse processo (Ebrahimi et al.⁸⁰ 2012).

Tendo em vista a diversidade de resultados encontrados em pesquisas em animais e os poucos estudos clínicos acerca do tema, torna-se necessário a realização de novos estudos a fim de verificar a real interferência da aplicação do laser em modelos animais e em estudos clínicos a fim de avaliar seu efeito na cicatrização óssea humana (Ebrahimi et al.⁸⁰ 2012), bem como as dosagens e tempo de aplicação mais apropriados (Tajali et al.⁸² 2010; Park et al.⁸³ 2013).

A fototerapia pode promover efeitos benéficos na cicatrização de tecidos e no reparo ósseo de modo multifatorial. Os mecanismos propostos pela literatura incluem

o aumento na síntese de colágeno e o metabolismo oxidativo mitocondrial, pelo efeito modulador da inflamação, da angiogênese e da atividade de macrófagos e linfócitos, e pelo estímulo para diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos e para proliferação celular. (Ebrahimi et al.⁸⁰ 2012; Karu, Pyatibrat e Afanasyeva⁸⁴ 2015; Lopes et al.⁸⁵ 2010; Torres et al.⁸⁶ 2008; Pinheiro et al.⁸⁷ 2011).

A radiação de laser em baixa intensidade também apresentou efeitos benéficos sobre as propriedades biomecânicas do osso após cicatrização de fraturas em modelo animal, sendo obtidos os melhores resultados com a aplicação de no mínimo 14 a 21 sessões de laserterapia (Tajali et al.⁸² 2010).

Estudo *in vivo* demonstrou que a irradiação de laser de GaAIs com comprimento de onda de 980nm colocado diariamente por 60 segundos até o dia 3, 5, 7, e 14, usando uma fibra óptica de 300 µm de diâmetro colocada a 5 mm do alvéolo, com uma potência de 0,01W em alvéolos pós-exodontia em ratos com e sem diabetes mellitus, provocou maior expressão de proteínas e genes de fatores de crescimento relacionados à atividade osteogênica em alvéolo de ratos após extração. Resultados os quais apontam para a contribuição da laserterapia para um menor tempo de recuperação pós-extração e uma melhor qualidade de vida em pacientes com condições sistêmicas capazes de provocar atraso no processo de reparo (Park et al.⁸³ 2012).

O uso da irradiação de laser de CO₂ aplicado em baixa intensidade promoveu também uma rápida formação de novo osso na camada superficial do alvéolo, favorecendo o reparo ósseo alveolar em ratos, especialmente quando combinado com o uso em alta intensidade (Fokuoka et al.²² 2011).

A utilização de laser em baixa intensidade juntamente com biomateriais para preenchimento de falhas ósseas pode otimizar o processo de reparo ósseo. Soares et al verificaram o reparo ósseo em defeitos em fêmur de ratos tratados ou não com HA+BTCP associado à laserterapia (780nm, 70mW, Ø0,4cm², 20J/cm² por sessão, 140J/cm² no total do tratamento), observou-se que o grupo que recebeu Hidroxiapatita + BTCP juntamente com laserterapia apresentou melhores resultados em comparação aos grupos tratados com laser ou com o biomaterial de maneira isolada. Esse efeito pode ser justificado pelo fato da laserterapia contribuir para o aumento da proliferação de fibroblastos, condroblastos e osteoblastos, além de promover maior produção de colágeno, que atua como um importante precursor para a deposição de hidroxiapatita (Soares et al.⁸⁸ 2014).

Um estudo verificou a associação do laser com enxerto ósseo autógeno ou bovino em cavidades ósseas criadas no crânio de ratos (780nm, 100mW, Ø0,05cm², 210J/cm², 60s/ponto, 6J/ponto, 4 pontos ao redor do defeito e no centro do defeito), demonstrando que a aplicação do laser proporcionou melhores resultados quanto ao reparo ósseo em comparação ao grupo onde a cavidade foi selada apenas com o coágulo sanguíneo. O aumento da vascularização provocado pela aplicação do laser de baixa potência pode ter sido um dos possíveis mecanismos para a eficácia do tratamento (Cunha et al.⁸⁹ 2014).

Já em humanos, um caso clínico comparou a utilização de hidroxiapatita associada ou não a aplicação de laser de baixa potência após extração de dois primeiros molares inferiores homólogos. Após 35 dias da extração foram realizadas biópsias dos dois locais e encaminhados para análise histológica. As análises demonstraram que a associação da hidroxiapatita com o laser provocou um processo de reparo ósseo mais rápido, diminuindo assim o tempo de espera necessário para a instalação do implante (Brawn e Kmong-Hing⁹⁰ 2007)

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar comparativamente o efeito do laser em baixa intensidade no processo de reparo ósseo pós-exodontia em alvéolos de ratos tratados com hidroxiapatita + β -fosfato tricálcico (HA β -TCP) e osso bovino inorgânico (OBI) após 7 e 14 dias.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Avaliar histológica e histomorfometricamente o processo de reparo alveolar pós-exodontia em alvéolos de ratos após 7 e 14 dias
- Avaliar histológica e histomorfometricamente o processo de reparo alveolar pós-exodontia em alvéolos de ratos tratados com TLBI após 7 e 14 dias.
- Avaliar histológica e histomorfometricamente o processo de reparo alveolar pós-exodontia em alvéolos de ratos tratados com HA β -TCP após 7 e 14 dias
- Avaliar histológica e histomorfometricamente o processo de reparo alveolar pós-exodontia em alvéolos de ratos tratados com HA β -TCP + TLBI após 7 e 14 dias.
- Avaliar histológica e histomorfometricamente o processo de reparo alveolar pós-exodontia em alvéolos de ratos tratados com OBI após 7 e 14 dias.
- Avaliar histológica e histomorfometricamente o processo de reparo alveolar pós-exodontia em alvéolos de ratos tratados com OBI + TLBI após 7 e 14 dias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SUJEITO DA PESQUISA

Foram utilizados 48 ratos machos (*Rattus Norvergicus Albinicus* linhagem Wistar) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Para esta pesquisa foram selecionados ratos com peso de 150–200g (2 meses de idade). Os animais permaneceram em gaiolas coletivas de 40 x 34 x 17cm, previamente descontaminadas com detergente enzimático e forradas com maravalha, identificadas de acordo com o grupo e o período pós-operatório, e foram limpas em dias alternados.

Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (20 - 24°C), umidade (45-55%) e iluminação (12 horas de luz e 12 horas de escuro) e alimentados com ração balanceada triturada e umedecida (Nuvilab CR1, Nuvital, Curitiba, PR, Brazil), e água a vontade durante todo o período experimental. Todo o delineamento experimental foi realizado de acordo com os critérios do Conselho Nacional de Pesquisa, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a lei 11794, de 8 de outubro de 2008. O protocolo foi submetido à Comissão de Ética Do Uso de Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa e aprovado pela mesma, processo CEUA -043/2014.

4.1.1. GRUPOS DA PESQUISA

Os animais foram divididos em seis grupos, sendo três controles e três experimentais. Cada grupo será subdividido de acordo com o período de acompanhamento (7 e 14 dias).

- Grupo Coágulo: C
 - Subgrupos: C7 e C14

Os ratos deste grupo foram submetidos apenas à exodontia do incisivo central superior direito, seguida da sutura. A sutura foi retirada no dia 5 pós-operatório. O grupo foi composto por 8 ratos, sendo 4 para cada subgrupo de acordo com o período de acompanhamento, sendo de 7 (C7) e 14 (C14) dias.

- Grupo Coágulo + TLBI: CL
 - Subgrupos: CL7 e CL14

Os ratos deste grupo foram submetidos à exodontia do incisivo central superior direito e irradiados com laser de baixa intensidade GaAIIAs (Twin Flex

Evolution[®], MMOptics, São Paulo- SP, Brasil) com comprimento de onda de 780nm, Ø 0,4 cm, potência de 10 mW por 1 minuto, repetindo a irradiação 5 vezes contínuas totalizando 5 minutos por aplicação. A energia entregue por minuto foi de 3J, totalizando 12J (Tim et al.⁹¹ 2016). A irradiação foi feita imediatamente após exodontia (dia 0), no dia seguinte (dia 1), no terceiro (dia 3) e no quinto dia (dia 5) pós-operatório. Após aplicação do laser foi feita a sutura. A sutura foi retirada no dia 5 pós-operatório. O grupo esteve composto por 8 ratos, sendo 4 para cada subgrupo de acordo com o período de acompanhamento, sendo de 7 (CL7) e 14 (CL14) dias.

- Grupo Osso bovino inorgânico: OB

- Subgrupos: OB7 e OB14

Os ratos deste grupo foram submetidos à exodontia do incisivo central superior direito, preenchimento do alvéolo com osso bovino inorgânico (Bio-Oss[®], Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça) e sutura. A sutura foi retirada no dia 5 pós-operatório. O grupo esteve composto por 8 ratos, sendo 4 para cada subgrupo de acordo com o período de acompanhamento, sendo de 7 (OB7) e 14 (OB14) dias.

- Grupo Osso bovino inorgânico + TBLI: OBL

- Subgrupos: OBL7 e OBL14

Os ratos deste grupo foram submetidos à exodontia do incisivo central superior direito, preenchimento do alvéolo com osso bovino inorgânico (Bio-Oss[®], Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça) e irradiados com laser de baixa intensidade GaAIs (Twin Flex Evolution[®], MMOptics, São Paulo- SP, Brasil) com comprimento de onda de 780nm, Ø 0,4 cm, potência de 10 mW por 1 minuto, repetindo a irradiação 5 vezes contínuas totalizando 5 minutos por aplicação. A energia entregue por minuto foi de 3J, totalizando 12J (Tim et al.⁹¹ 2016). A irradiação foi feita imediatamente após exodontia (dia 0), no dia seguinte (dia 1), no terceiro (dia 3) e no quinto dia (dia 5) pós-operatório. Após aplicação do laser foi feita a sutura. A sutura foi retirada no dia 5 pós-operatório. O grupo esteve composto por 8 ratos, sendo 4 para cada subgrupo de acordo com o período de acompanhamento sendo de 7 (OBL7) e 14 (OBL14) dias.

- Grupo Hidroxiapatita e β -fosfato tricálcico: HA

- Subgrupos: HA7 e HA14

Os ratos deste grupo foram submetidos à exodontia do incisivo central superior direito, preenchimento do alvéolo com Hidroxiapatita e β -fosfato tricálcico (Clonos®, Neodent, Curitiba, PR, Brasil) e sutura. A sutura foi retirada no dia 5 pós-operatório. O grupo esteve composto por 8 ratos, sendo 4 para cada subgrupo de acordo com o período de acompanhamento, sendo de 7 (HA7) e 14 (HA14) dias.

- Grupo Hidroxiapatita e β -fosfato tricálcico + TBLI: HAL

- Subgrupos: HAL7 e HAL14

Os ratos deste grupo foram submetidos à exodontia do incisivo central superior direito, preenchimento do alvéolo com Hidroxiapatita e β -fosfato tricálcico (Clonos®, Neodent, Curitiba, PR, Brasil) e irradiados com laser de baixa intensidade GaAIs (Twin Flex Evolution®, MMOptics, São Paulo- SP, Brasil) com comprimento de onda de 780nm, \emptyset 0,4 cm, potência de 10 mW por 1 minuto, repetindo a irradiação 5 vezes contínuas totalizando 5 minutos por aplicação. A energia entregue por minuto foi de 3J, totalizando 12J (Tim et al.⁹¹ 2016). A irradiação foi feita imediatamente após exodontia (dia 0), no dia seguinte (dia 1), no terceiro (dia 3) e no quinto dia (dia 5) pós-operatório. Após aplicação do laser foi feita a sutura. A sutura foi retirada no dia 5 pós-operatório. O grupo esteve composto por 8 ratos, sendo 4 para cada subgrupo de acordo com o período de acompanhamento, sendo de 7 (HAL7) e 14 (HAL14) dias.

4.2. PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS

4.2.1. MANEJO PRE-OPERATÓRIO

Os ratos foram mantidos em jejum no dia da cirurgia, doze horas antes do procedimento.

4.2.1.1. ANESTESIA

Os animais foram anestesiados e sedados com cloridrato de ketamina 10% (Cetamin®; Syntec Ltda, Cotia, SP, Brasil) 70mg/kg e cloridrato de xilazina 2% (Xilazin®; Syntec Ltda, Cotia, SP, Brasil) 10mg/kg, administrados via intraperitoneal (**Fig. 1**).

4.2.2. MANEJO OPERATÓRIO

O procedimento cirúrgico foi realizado em animais com 60 dias de vida e com massa corpórea entre 150 e 200g

4.2.2.1. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Inicialmente, foi realizado a desinfecção da mesa cirúrgica e a colocação do campo estéril. Os animais foram colocados em posição decúbito dorsal com a cabeça cuidadosamente mantida na direção do operador. Em seguida, foi realizada a antisepsia do campo operatório com uma solução de iodopovidona e colocação do campo estéril fenestrado (**Fig. 2 e 3**).

Para a realização da exodontia do incisivo superior direito foram utilizados instrumentos apropriados para a anatomia do dente de rato: Periotomo (Hu-Friedy, Rockwell St. Chicago, Illinois, USA) para sindesmotomia da gengiva marginal e luxação no sentido mesio-distal e vestibulo palatino, e uma pinza hemostática modificada para a avulsão da peça. Para o controle de sangramento usou-se compressas de gaze.

No grupo C, após a exodontia foi feita a sutura do alvéolo. No grupo CL, após exodontia foi feita a TLBI e a sutura. No grupo OB, os alvéolos foram preenchidos com 30mg de osso bovino inorgânico e suturados. No grupo OB, os alvéolos foram preenchidos com 30mg de osso bovino inorgânico + TLBI e suturados. No grupo HA, os alvéolos foram preenchidos com 30mg de HA β -TCP e suturados. No grupo HA, os alvéolos foram preenchidos com 30mg de HA β -TCP + TLBI e suturados.

Para todos os casos, o biomaterial foi colocado num tubo de eppendorf esterilizado de 1,5ml, pesado na balança analítica para padronizar a quantidade

(30mg), foi triturado manualmente com auxílio de uma espátula de resina esterilizada e colocou-se 1ml de soro fisiológico para hidratação do biomaterial 20 minutos. Para a colocação do substituto ósseo no alvéolo foi usado uma cone de guta-percha para garantir a entrada do material em todo o comprimento do alvéolo (**Fig. 4, 5 e 6**).

Em todos os casos utilizou-se fio de seda preta 4.0 para sutura da mucosa (Ethicon; Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil) (**Fig.7**). Foi usado um equipamento de laser multifuncional Twin Flex Evolution® (MMOptics, São Paulo, Brasil) e a TLBI (GaAIIAs, λ 780nm, 10mW, \varnothing 0,4cm, 75J/cm², 300s) foi feita imediatamente após a exodontia, ao dia seguinte (dia 1), ao terceiro (dia 3) e ao quinto dia (dia 5) pós-operatório em sessões de 5 minutos.

As partículas trituradas do biomaterial foram visualizadas e mensuradas no Microscópio Eletrônico de varredura com emissão de campo- FEG (TESCAN MIRA 3 LMH) para observar a variação do tamanho das mesmas após trituração (**Fig. 8**).

Cabe comentar que foi feito um treinamento prévio para a realização das exodontias pois devido a característica morfológica do dente do rato, é um desafio desenvolver a técnica com sucesso nas primeiras tentativas.

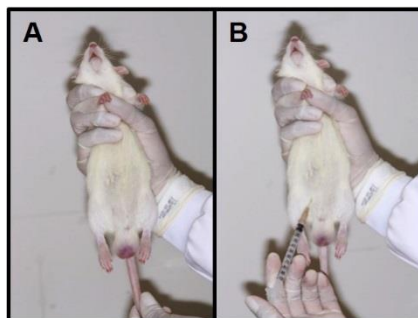


Figura 1. A. Técnica para segurar o rato. **B.** Aplicação de anestesia intraperitoneal (Fonte: autora)



Figura 2. Assepsia e antissepsia do campo operatório com solução de iodopovidone (Fonte: autora)



Figura 3. Colocação do campo estéril (Fonte: autora)

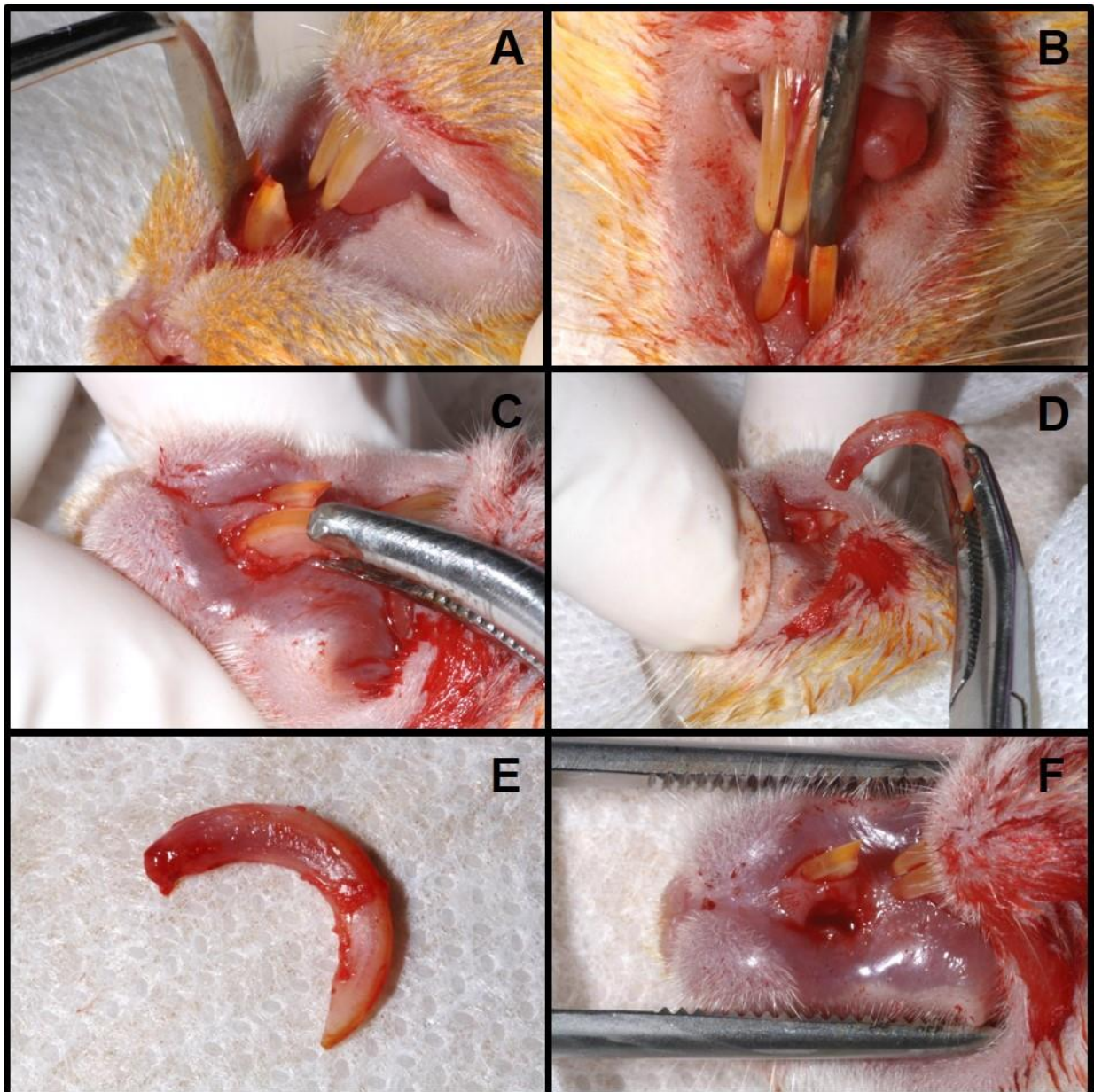


Figura 4. A. Sindesmotomia da gengiva marginal com o uso do periótomo. B. Luxação do incisivo. C - D. Avulsão do dente com pinça hemostática modificada. E. Incisivo superior direito. F. Aspecto clínico do alvéolo pós-exodontia (Fonte: autora)

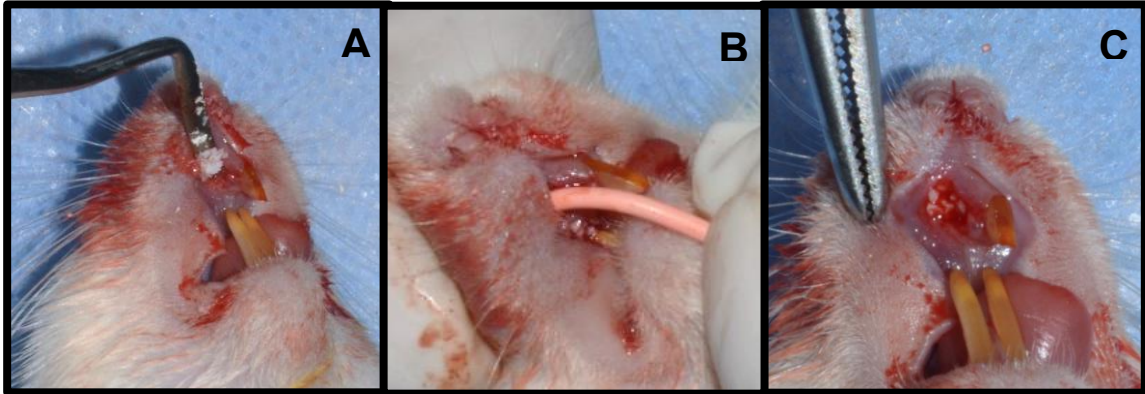


Figura 5. A. Colocação do biomaterial. B. Preenchimento do biomaterial com cone de gutapercha. C. Alvéolo preenchido de biomaterial



Figura 6. Aplicação do laser de baixa intensidade
(Fonte: autora)



Figura 7. Sutura do alvéolo com fio de seda 4.0
(Fonte: autora)

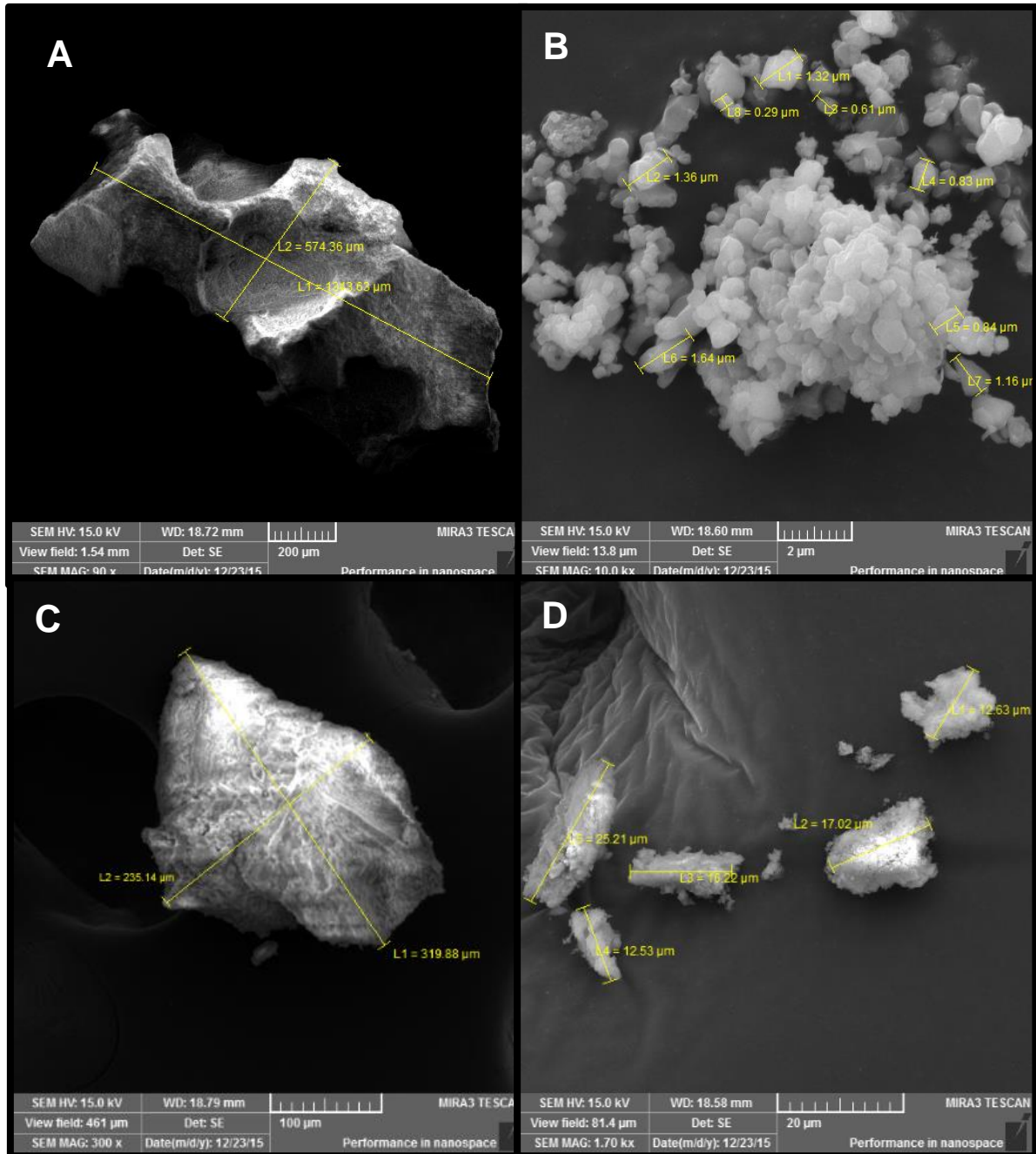


Figura 8. Fotomicrografia realizadas no FEG (Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo) **A.** Partícula de Clonus® sem triturar **B.** Partícula de Clonus® triturada **C.** Partícula de Bio-Oss® sem triturar **D.** Partícula de Bio-Oss® após trituração manual (Fonte: autora)

4.2.3. MANEJO PÓS-OPERATÓRIO

4.2.3.1. MEDICAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam uma dose única (0,1mL por cada 100g) de Antibiótico Polivalente Veterinário de Benzilpenicilina benzatina + Benzilpenicilina procaína + Benzilpenicilina potássica + Diidroestreptomicina base (sulfato) + Estreptomicina base (sulfato) (Pentabiótico Veterinário, Fontoura-Wyeth, São Bernardo do Campo, SP, Brasil).

4.2.3.2. CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIO

Os animais foram colocados nas suas gaiolas, em posição supina e mantidas em gaiolas individuais até a anestesia passar; a alimentação constou de ração balanceada triturada e umedecida, e água a vontade durante todo o período experimental.

4.2.4. PROTOCOLO DE EUTANÁSIA

Foi feita por deslocamento cervical, previamente os animais foram anestesiados e sedados com cloridrato de ketamina 10% (Cetamin®; Syntec Ltda, Cotia, SP, Brasil), 70ml/kg, e cloridrato de xilazina 2% (Xilazin®; Syntec Ltda, Cotia, SP, Brasil) 10ml/kg, administrados via intraperitoneal. A anestesia foi injetada com o auxílio de uma seringa descartável de insulina.

A eutanásia foi realizada nos períodos pós - operatório definidos em 7 e 14 dias para os seis grupos. Sendo assim, 4 ratos foram sacrificados por cada subgrupo, os quais foram processados para análise histológica e histomorfométrica, totalizando 48 animais.

4.2.5. COLETA E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

4.2.5.1. COLETA

Depois da eutanásia, a maxila foi dissecada, removida e reduzida as partes ósseas que contém o alvéolo dental com o auxílio de lâminas para micrótomo e de bisturi número 15 (**Fig.9**).

4.2.5.2. PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ CONVENCIONAL

As amostras obtidas foram colocadas em frascos previamente preparados e

etiquetados, contendo solução de formalina a 10% tamponada para fixação por 24 horas, lavadas em água corrente por 12 horas e desmineralizadas em solução de EDTA 4% em pH 8,0. O processo de desmineralização durou aproximadamente 30 dias e a solução de EDTA foi trocada a cada dois dias para evitar a saturação da mesma e, conseqüentemente, o atraso do processo. O processo de desmineralização foi monitorado por punção dos dentes molares dos ratos (**Fig. 10 e 11**). Uma vez concluído este processo, foram lavadas em água corrente por 24 horas.

As 48 amostras foram reduzidas, logo cortadas em sentido transversal ao eixo do dente incisivo, finalmente divididas em três partes: terço coronal (A), médio (B) e apical (C), sendo avaliado neste estudo o terço médio (**Fig. 12, 13 e 14**). Foram dados códigos alfanuméricos para todas as amostras no intuito de mascará-las, contendo números do 1 ao 48 e as letras A, B e C segundo a porção do dente. As peças foram sinalizadas na borda mais anterior com tinta nankin (para facilitar a posterior inclusão em parafina no sentido buco-palatino) (**Fig.15**) e colocadas em casquetes previamente identificados (**Fig. 16**), para serem desidratadas gradualmente em álcool. Em seguida, foram diafanizadas em xilol, uma vez terminado o processo, foram incluídas em parafina. Os blocos de parafina foram submetidos a cortes transversais com 6µm de espessura com auxílio de um micrótomo (Leica RM 2125T Nussloch, Alemanha). Foram realizadas 4 cortes por amostras, com intervalo de 60µm (10 voltas da manivela do micrótomo) e coradas com Hematoxilina de Harris e Eosina de Lison (HE).

Para análise histológica ou qualitativa, foram obtidos quatro cortes semi-seriados, sendo que apenas dois foram selecionados. Foi utilizado um microscópio óptico (Olympus BX41, Tokyo, Japão) com objetiva objetiva Zeiss Kpl de 40x (Carl Zeiss Micro Imaging Inc), onde foram analisados os tipos celulares, as distribuições e as características do tecido ósseo neoformado nos diferentes períodos.

Para análise histomorfométrica ou quantitativa, foram obtidos quatro cortes semi-seriados, sendo que apenas dois foram selecionados. Foi utilizado um microscópio óptico (Olympus BX41, Tokyo, Japão), objetiva Zeiss Kpl de 40x (Carl Zeiss Micro Imaging Inc) e uma câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio, obtendo-se fotomicrografias de 5 regiões: Parede interna, externa, superior, inferior e região central do alvéolo (**Fig.17**). Foram capturadas 5 fotomicrografias por lâmina, totalizando 480 laminas para a análise.

As imagens foram analisadas com o auxílio do software ImageJ, foi utilizada

uma grade constituída de 12 por 9 linhas paralelas com 108 pontos simetricamente distribuídos dentro dessa área quadrangular (Pereira et al.⁹² 2007) (**Fig. 18 e 19**). As estruturas quantificadas pela análise histomorfométrica foram: Matriz óssea, osteócitos, osteoblastos, osteoclastos, células inflamatórias, fibroblastos/fibrócitos, matriz extracelular, vasos sanguíneos e hemácias fora do vaso.



Figura 9. Obtenção da amostra
(Fonte: autora)



Figura 10. Comprovação da descalcificação
(Fonte: autora)

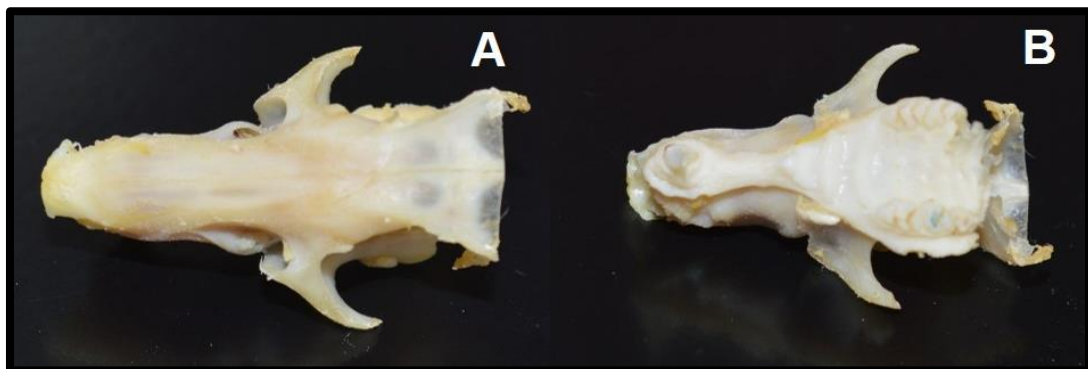


Figura 11. A e B. Vista da amostra descalcificada
(Fonte: autora)

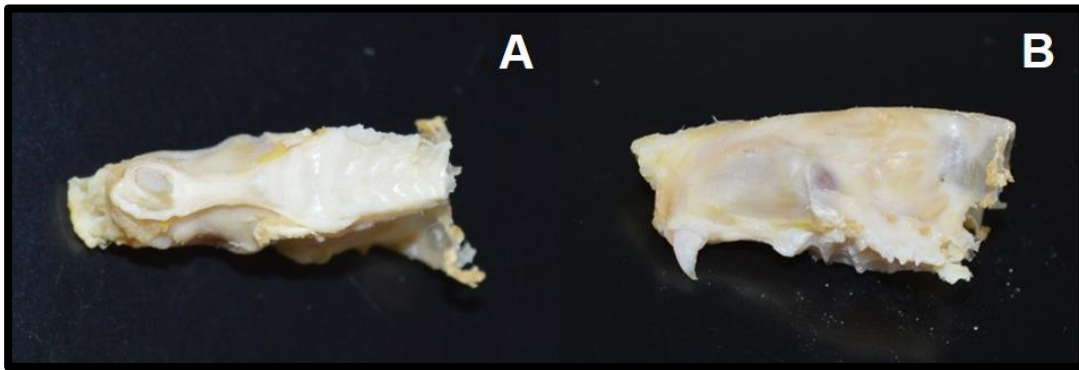


Figura 12. A e B. Vista oclusal superior e lateral da amostra reduzida (Fonte: autora)

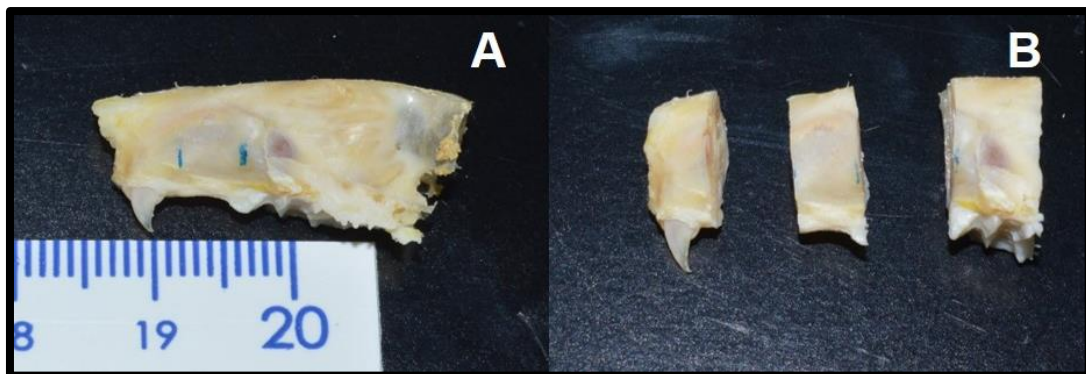


Figura 13. A. Medição do comprimento do alvéolo **B.** Divisão em terços coronal, médio e apical (Fonte: autora)



Figura 14. Vista do corte transversal do terço médio (Fonte: autora)

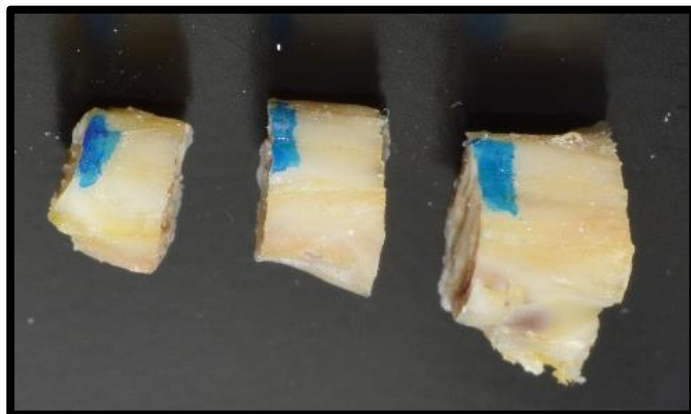


Figura 15. Amostras marcadas com tinta nankin para facilitar a colocação no momento da inclusão (Fonte: autora)

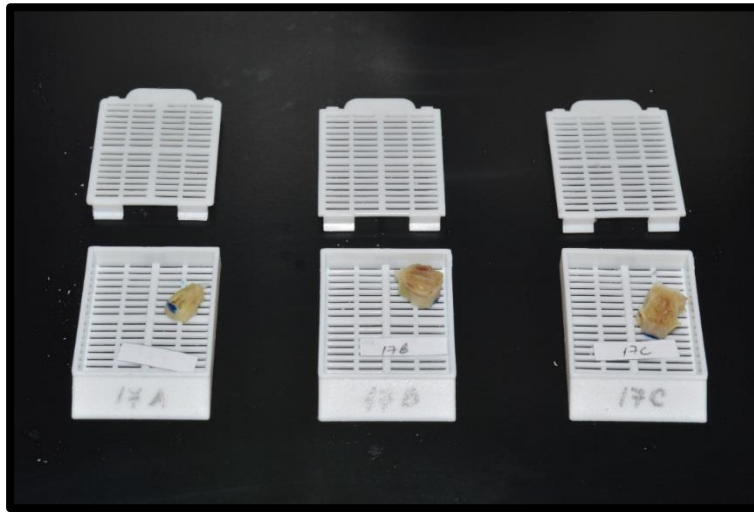


Figura 16. Colocação das amostras nos casquetes etiquetados para serem processadas no histotécnico (Fonte: autora)

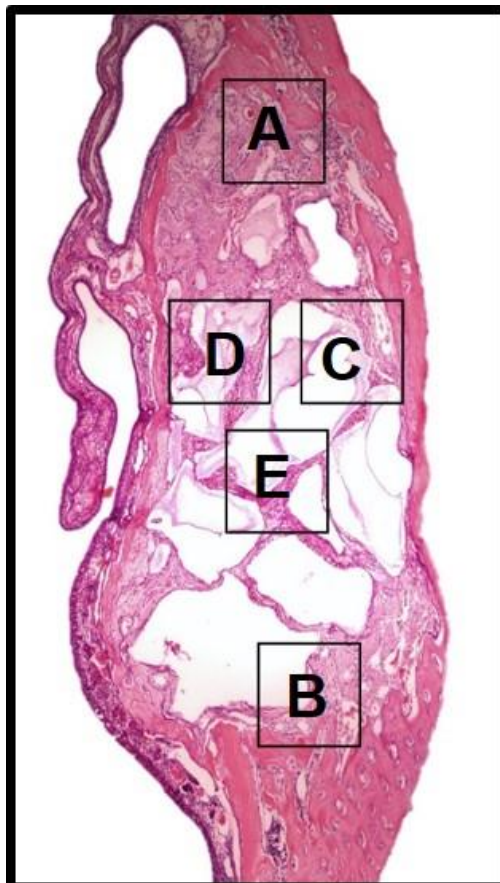


Figura 17. Fotomicrografia do corte transversal do terço médio do alvéolo. **A.** Parede superior **B.** Parede inferior **C.** Parede externa **D.** Parede Interna **E.** Centro do alvéolo (40X-HE) (Fonte: autora)

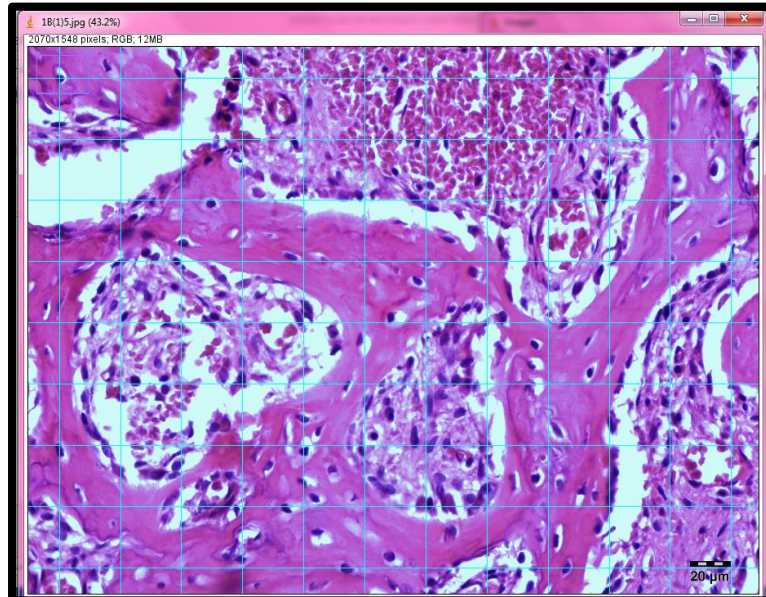


Figura 18. Fotomicrografia de alvéolo com grade para análise histomorfométrica do software ImageJ (400X-HE). (Fonte: autora)

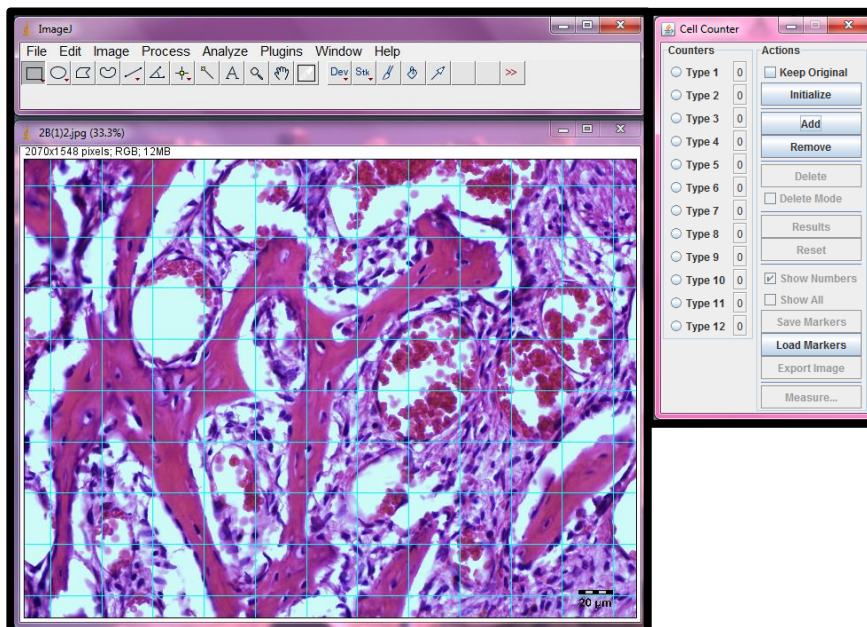


Figura 19. Fotomicrografia de alvéolo com grade e contador de células para análise histomorfométrica do software ImageJ (400X-HE) (Fonte: autora).

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram submetidos aos testes de normalidade e de Igualdade de Variâncias após transformação. Para a comparação estatística dos resultados foi utilizado o teste de MANOVA de uma via (tipo de tratamento), seguido do teste de Games-Howell. Todos os testes foram executados pelo software SPSS 23 (IBM SPSS Statistics 23, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Foram analisados as mesmas fotomicrografias escolhidas para a análise histomorfométrica, avaliando as 5 regiões: Parede interna, externa, superior, inferior do alvéolo e região central.

5.1.1. ANÁLISE AOS 7 DIAS

Grupo Coágulo: C7

Aos sete dias, observaram-se presença discreta de trabéculas ósseas delgadas (osso neoformado), os espaços medulares encontravam-se contidas de fibras colágenas desorganizadas, poucas regiões mostraram maturação das mesmas. No centro dos alvéolos ainda podia se notar resíduos de coágulo e células inflamatórias (Fig. 20A, 21A, 22A, 23A, 24A).

Grupo Coágulo + TLBI: CL7

Aos setes dias, na periferia dos alvéolos se observaram presença discreta de trabéculas ósseas delgadas (osso neoformado) circundadas por osteoblastos. Nos espaços medulares se observaram tecido de granulação constituído por fibras colágenas, fibroblastos, grande quantidade de vasos sanguíneos. Observou-se várias regiões de maturação das fibras colágenas (Fig. 20B, 21B, 22B, 23B, 24B). Um dos espécimenes apresentou microabcesso na região central.

Grupo Osso Bovino Inorgânico: OB7

Aos sete dias, encontraram-se escassa quantidade de trabéculas ósseas delgadas (osso neoformado) próximas as paredes do alvéolo e, também, circundando partículas do biomaterial. Algumas trabéculas apresentavam linhas basófilas. No centro do alvéolo, também observou-se o biomaterial mas rodeado de tecido conjuntivo e algumas células gigantes, hemácias e células inflamatórias (Fig. 20C, 21C, 22C, 23C, 24C). Um dos animais presentou foco de infiltrado inflamatório na região central e na parede superior do alvéolo.

Grupo Osso Bovino Inorgânico + TLBI: OBL7

Na periferia do alvéolo, observou-se trabéculas ósseas (osso neoformado) circundando algumas partículas do biomaterial. Além disso, observou-se linhas cementantes finas e desorganizadas e algumas regiões de matriz mineralizada. No centro do alvéolo, encontraram-se partículas do biomaterial, fibras colágenas desorganizadas, hemácias e células inflamatórias. Um dos animais apresentou infiltrado inflamatório entre a parede externa e a região central do alvéolo (Fig. 20D, 21D, 22D, 23D, 24D).

Grupo HA β -TCP: HA7

Aos sete dias, encontrou-se osso neoformado em toda a periferia do alvéolo, sobretudo na parede superior e inferior; além disso, haviam partículas de biomaterial rodeadas de osso imaturo. No centro do alvéolo, partículas rodeadas de tecido de granulação (Fig. 20E, 21E, 22E, 23E, 24E).

Grupo HA β -TCP + TLBI: HAL7

Observou-se osso neoformado em todas as paredes do alvéolo exceto na parede externa; desde as paredes e em direção centrípeta, notava-se finas trabéculas na periferia do biomaterial. No centro dos alvéolos, encontraram-se partículas de biomaterial, a maioria delas rodeadas de tecido de granulação. (Fig. 20F, 21F, 22F, 23F, 24F).

- Parede superior

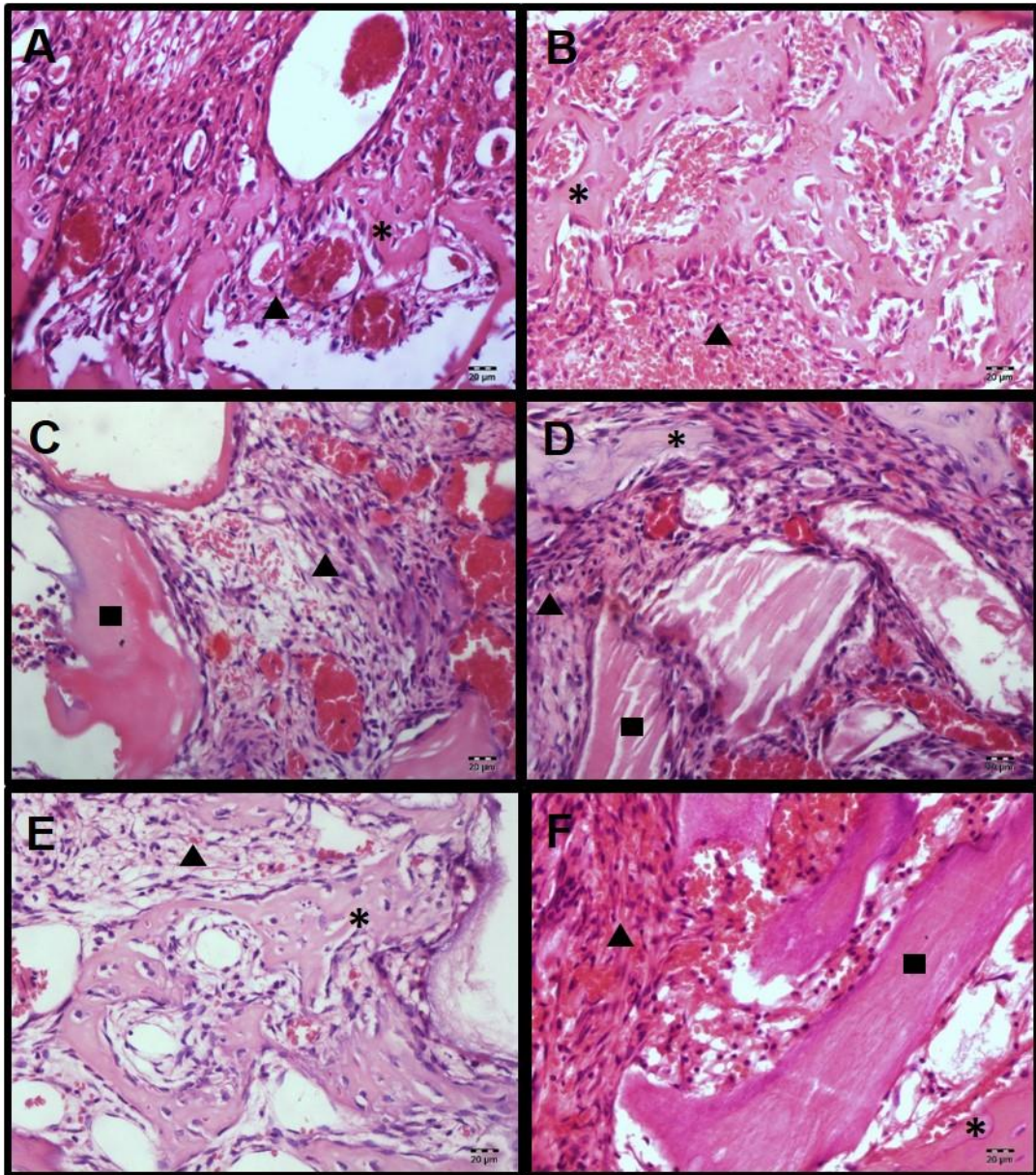


Figura 20. Fotomicrografias representativas da parede superior dos alvéolos aos 7 dias (400x- HE). **A, B, C, D, E e F.** Grupo C7, CL7, OB7, OBL7, HA7, HAL7 respectivamente. Presença de osso neoformado (*), tecido conectivo (▲), material (■)

- Parede inferior

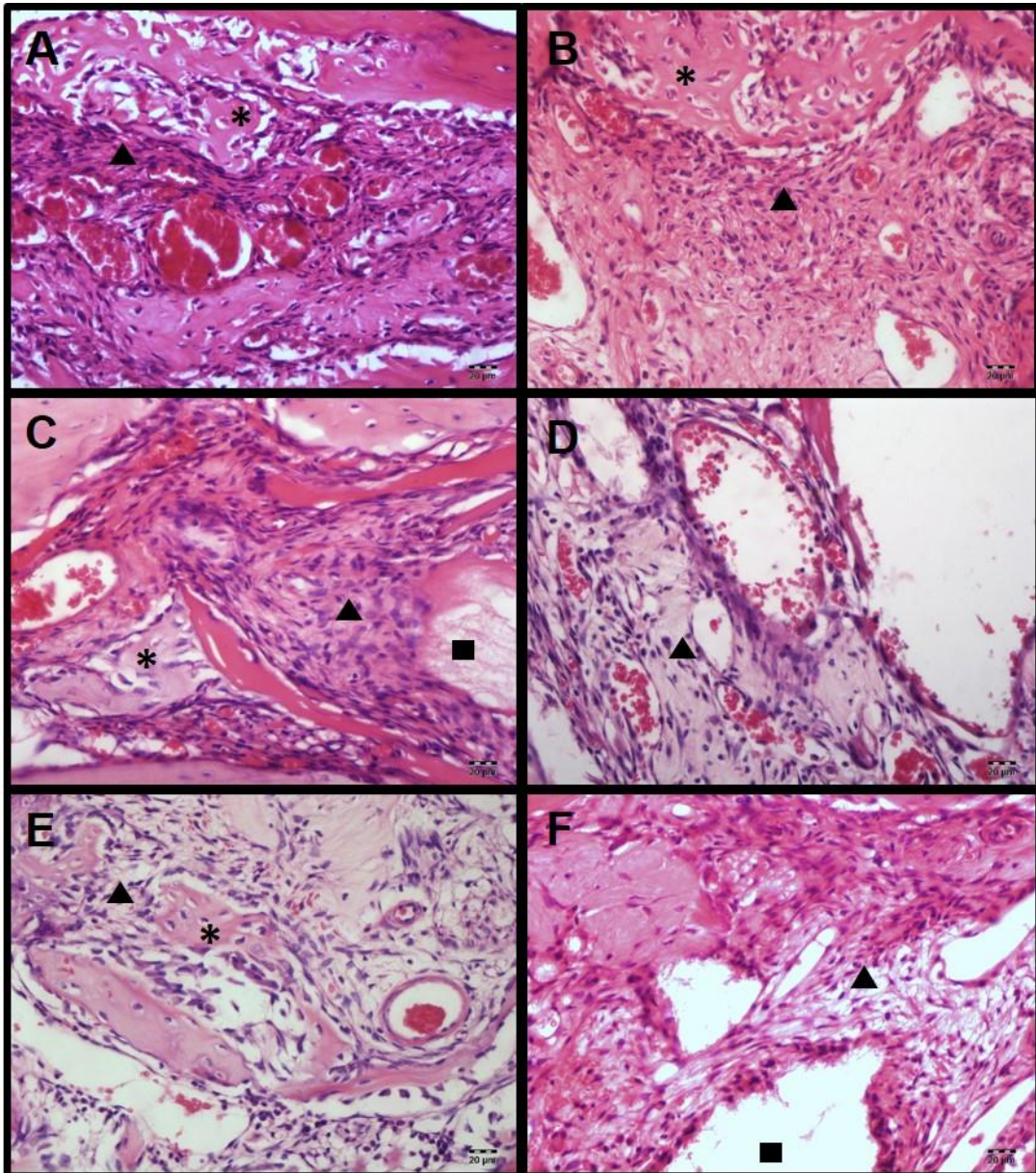


Figura 21. Fotomicrografias representativas da parede inferior dos alvéolos aos 7 dias (400x- HE). **A, B, C, D, E e F.** Grupo C7, CL7, OB7, OBL7, HA7, HAL7 respectivamente. Presença de osso neoformado (*), tecido conectivo (▲), material (■). Note-se em F, área de maior densidade do tecido conectivo

- Parede externa

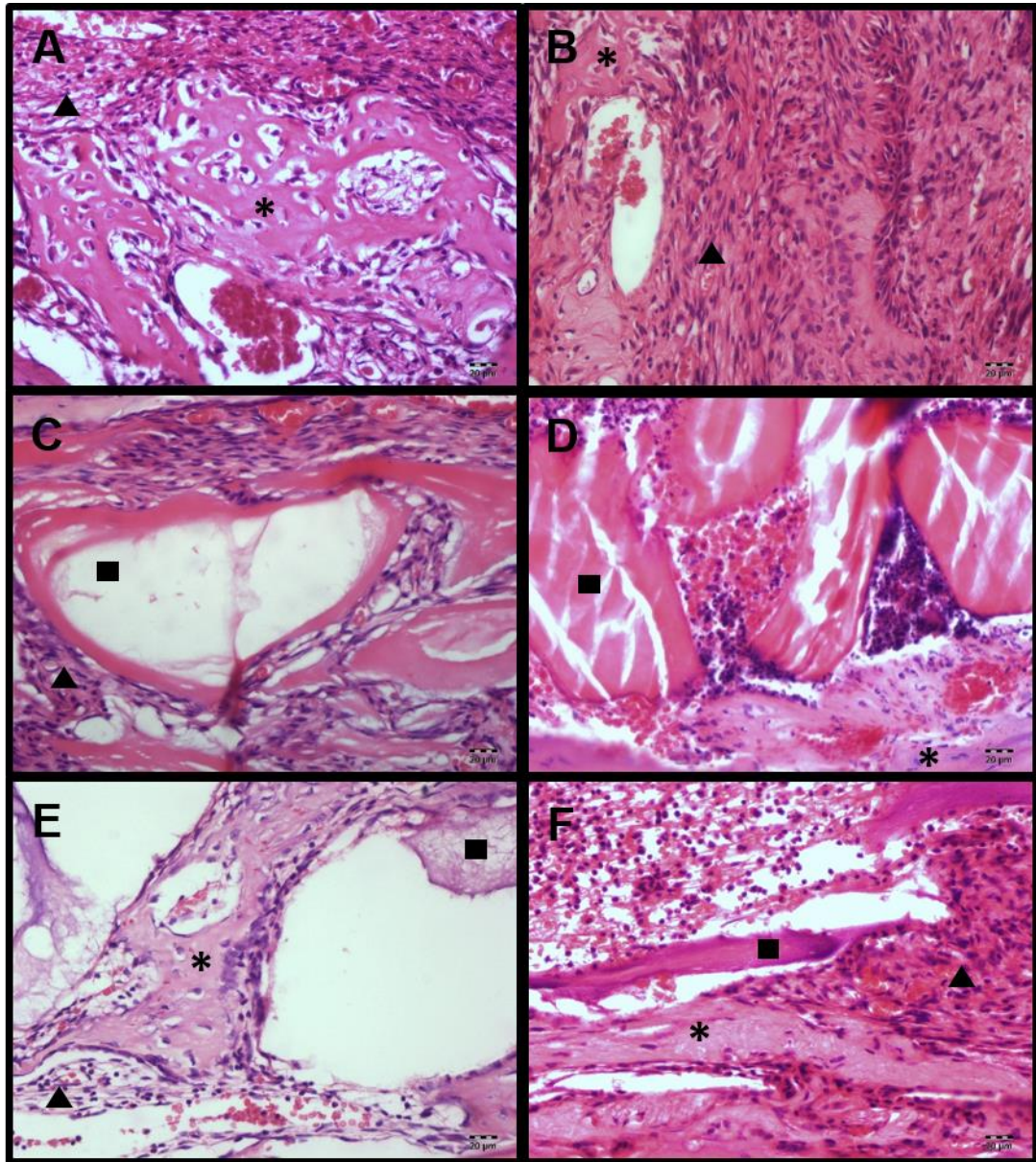


Figura 22. Fotomicrografias representativas da parede externa dos alvéolos aos 7 dias (400x- HE). **A, B, C, D, E e F.** Grupo C7, CL7, OB7, OBL7, HA7, HAL7 respectivamente. Presença de osso neoformado (*), tecido conectivo (▲), material (■). Note-se em D presença de foco inflamatório ao redor do biomaterial.

- Parede interna

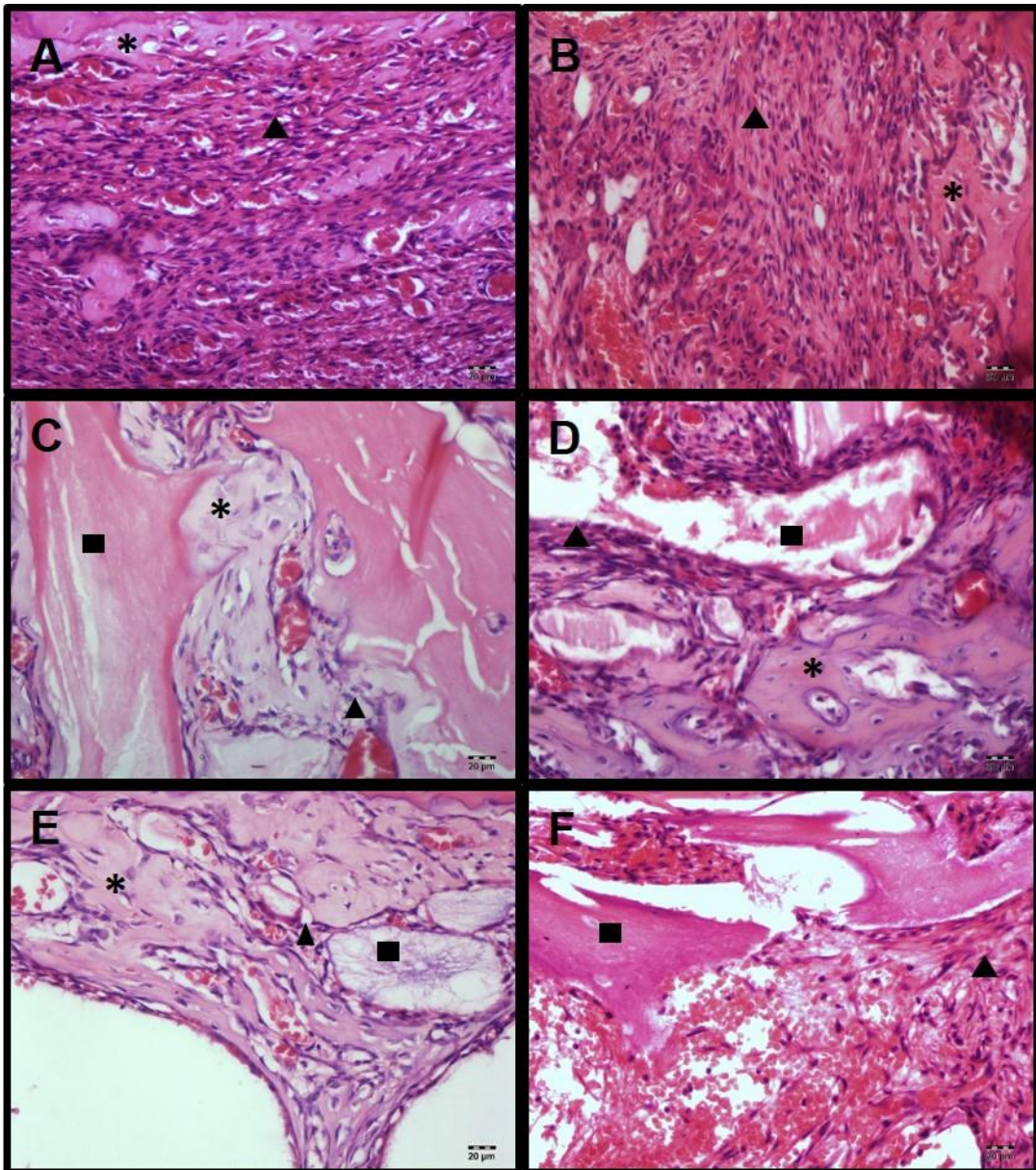


Figura 23. Fotomicrografias representativas da parede interna dos alvéolos aos 7 dias (400x- HE). **A, B, C, D, E e F.** Grupo C7, CL7, OB7, OBL7, HA7, HAL7 respectivamente. Presença de osso neoformado (*), tecido conectivo (▲), material (■). Note-se em D, osso neoformado com maior grau de mineralização.

- Centro do alvéolo

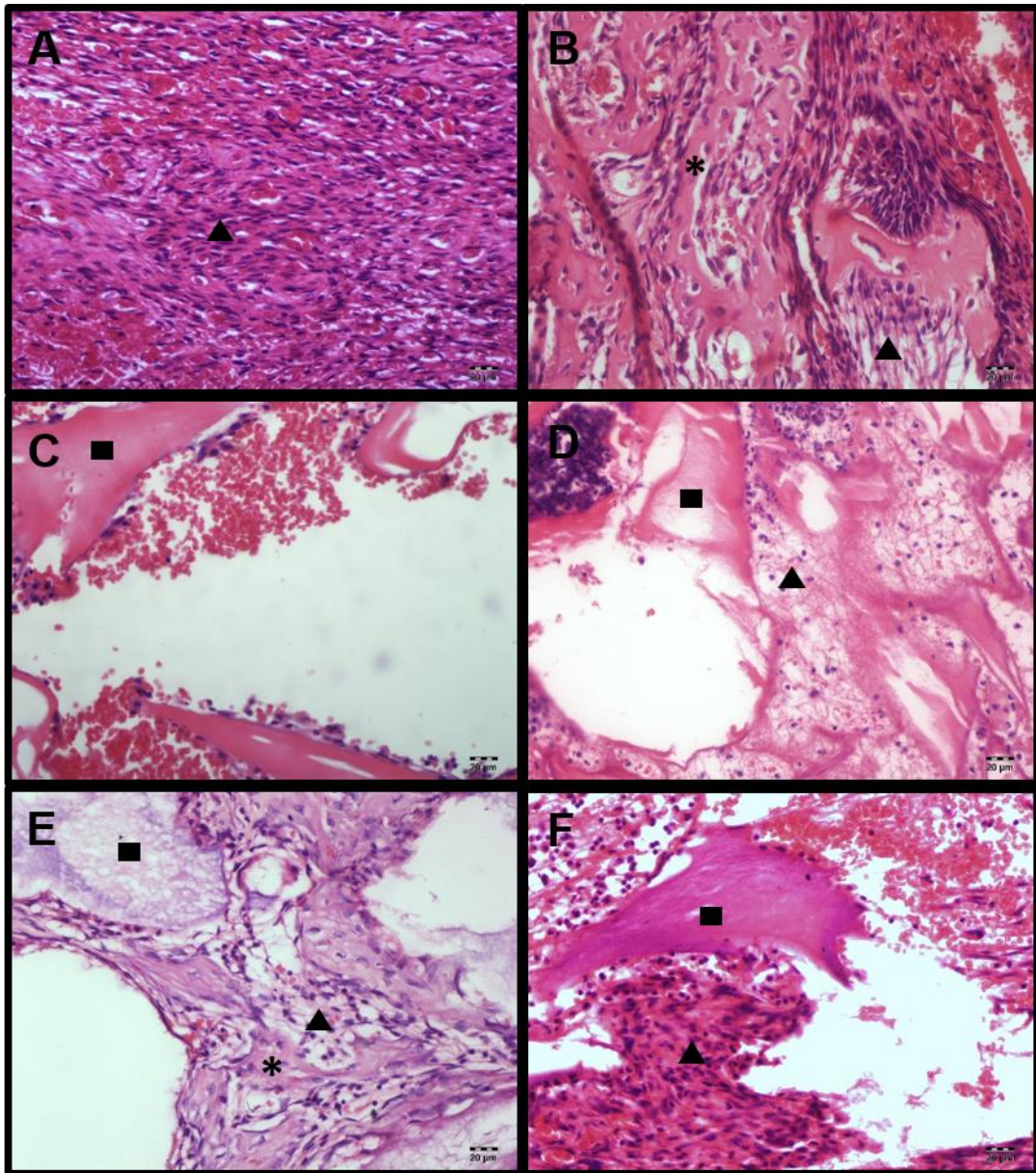


Figura 24. Fotomicrografias representativas da parede interna dos alvéolos aos 7 dias (400x- HE). **A, B, C, D, E e F.** Grupo C7, CL7, OB7, OBL7, HA7, HAL7 respectivamente. Presença de osso neoformado (*), tecido conectivo (▲), material (■). Note-se em B a importante presença osteoblástica.

5.1.2. ANÁLISE AOS 14 DIAS

Grupo Coágulo: C14

Aos catorze dias, os alvéolos dentários encontraram-se parcialmente preenchidos por osso neoformado caracterizado por trabéculas ósseas delgadas e desorganizadas (a maioria delas não mineralizadas). O tecido conjuntivo apresentou-se dentro dos padrões de normalidade em relação as fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos. Além disso, observou-se regiões de maior densidade (Fig. 24A, 25A, 26A, 27A, 28A). Um dos espécimes apresentou foco de infiltrado inflamatório e preenchimento incompleto do alvéolo na região central do mesmo.

Grupo Coágulo + TLBI: CL14

Aos catorze dias, os alvéolos apresentaram trabéculas ósseas levemente maiores quando comparados com o grupo I14, veem-se linhas cementantes (basófilas) que representam o limite entre a matriz óssea já existente e a recém depositada, grande presença de osteoblastos, fibroblastos e fibras colágenas. Na região central se observou um tecido de granulação mais organizado mostrando fibras colágenas dispostas paralelamente. Discreta presença de células inflamatórias (Fig. 24B, 25B, 26B, 27B, 28B).

Grupo Osso bovino inorgânico: OB14

Aos catorze dias, os alvéolos dentários encontraram-se parcialmente preenchidos por osso neoformado, várias trabéculas ósseas de uma cor mais acidófila que demonstra falta de mineralização, de formato variado comparado com o grupo IV14. No centro do alvéolo pode ser observar presença do biomaterial. Houve um espécime que apresentou microabscesso na região central do alvéolo (Fig. 24C, 25C, 26C, 27C, 28C).

Grupo Osso bovino inorgânico + TLBI: OBL14

Aos catorze dias, observou-se maior quantidade de osso neoformado quando comparado com o grupo III14, as trabéculas tinham várias linhas cementantes (basófilas) que é o limite entre a matriz recém depositada e matriz mineralizada que nos demonstra um grau de mineralização maior nesse osso. Pode se notar trabéculas circundando o biomaterial com osteoblastos na periferia das trabéculas; e importante

presença osteoblástica. Houve um espécime que apresentou microabscesso na região central do alvéolo (Fig. 24D, 25, 26D, 27D, 28D).

Grupo HA β -TCP: HA14

Aos catorze dias, os alvéolos dentários encontraram-se parcialmente preenchidos por osso neoformado com trabéculas ósseas delgadas, por vezes estas trabéculas circundavam ou aprisionavam pequenas ou moderadas quantidades do remanescente do biomaterial. Observou-se partículas maiores do biomaterial quando comparado com o grupo VI14. O tecido conjuntivo apresentou-se dentro dos padrões de normalidade em relação as fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos mas em alguns cortes observou-se discreta a moderada inflamação. Um dos espécimes apresentou microabscesso na região central e na parede interna do alvéolo (Fig. 24E, 25E, 26E, 27E, 28E).

Grupo HA β -TCP + TLBI: HAL14

Aos catorze dias, podia ser observar trabéculas mais engrossadas que no grupo V14, linhas cementantes indicando uma fase de mineralização do osso neoformado, menor quantidade de biomaterial quando comparado com o grupo V14 estando rodeado de osso neoformado (Fig. 24A, 25A, 26A, 27A, 28A).

- Parede superior do alvéolo

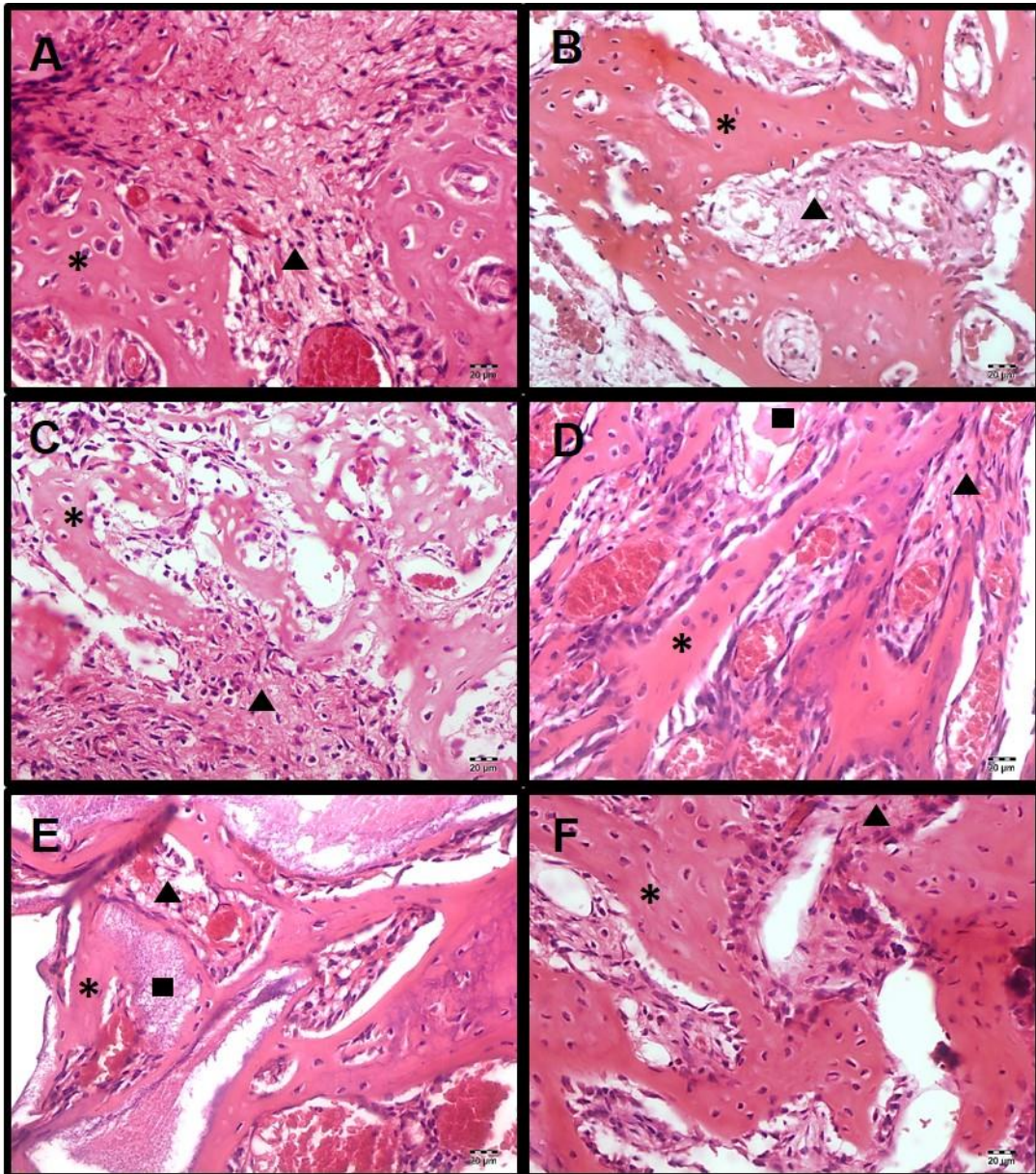


Figura 25. Fotomicrografias representativas da parede superior dos alvéolos aos 14 dias (400x- HE). **A, B, C, D, E e F.** Grupo C14, CL14, OB14, OBL14, HA14, HAL14 respectivamente. Presença de osso neoformado (*), tecido conectivo (▲), material (■). Note-se em D linhas basófilas no osso; em E osso neoformado ao redor do biomaterial.

- Parede Inferior do alvéolo:

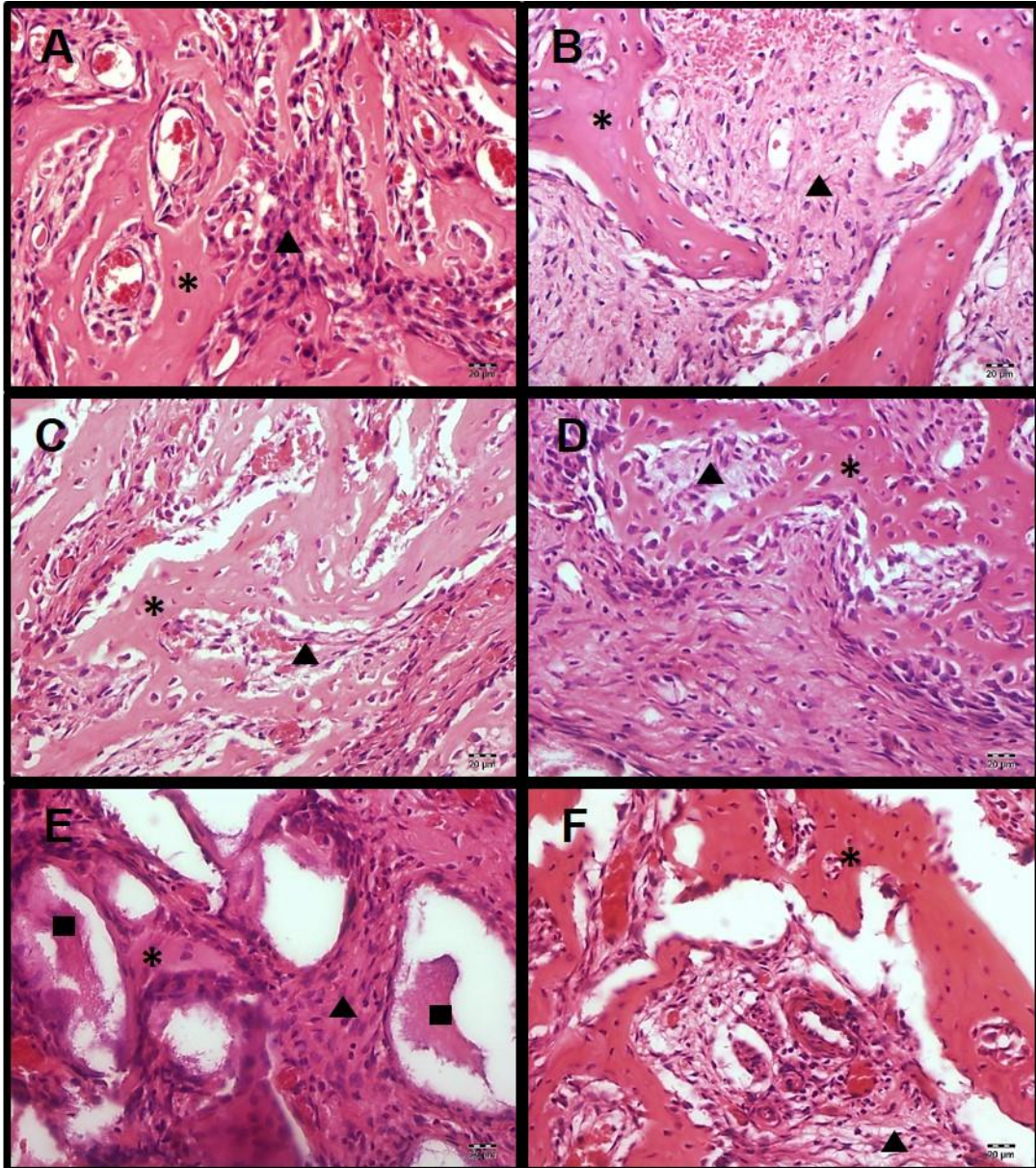


Figura 26. Fotomicrografias representativas da parede inferior dos alvéolos aos 14 dias (400x- HE). **A, B, C, D, E e F.** Grupo C14, CL14, OB14, OBL14, HA14, HAL14 respectivamente. Presença de osso neoformado (*), tecido conectivo (▲), material (■).

- Parede Externa:

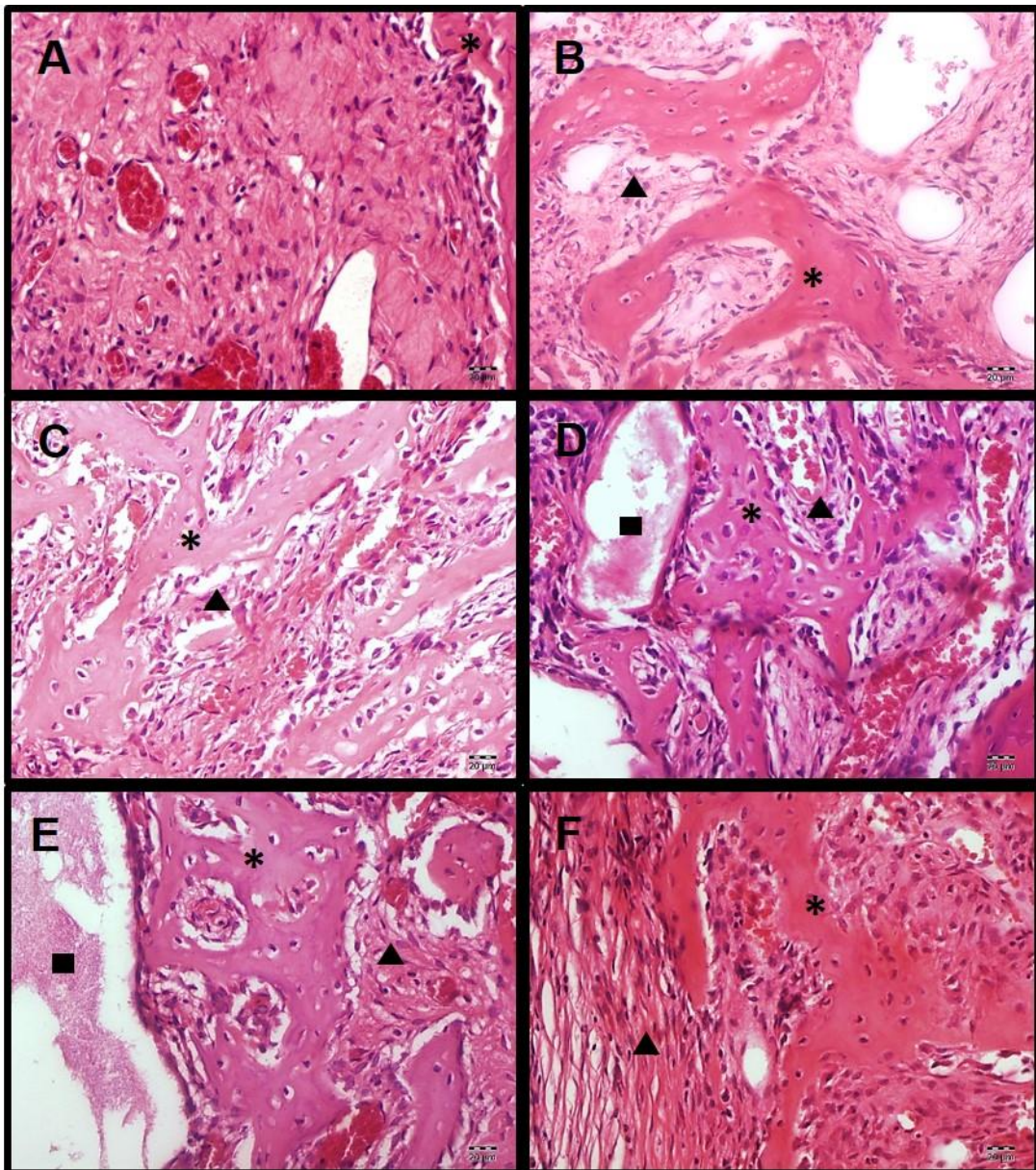


Figura 27. Fotomicrografias representativas da parede externa dos alvéolos aos 14 dias (400x- HE). **A, B, C, D, E e F.** Grupo C14, CL14, OB14, OBL14, HA14, HAL14 respectivamente. Presença de osso neoformado (*), tecido conectivo (▲), material (■). EM **B, D e E** linhas cementantes no osso neoformado

- Parede Interna:

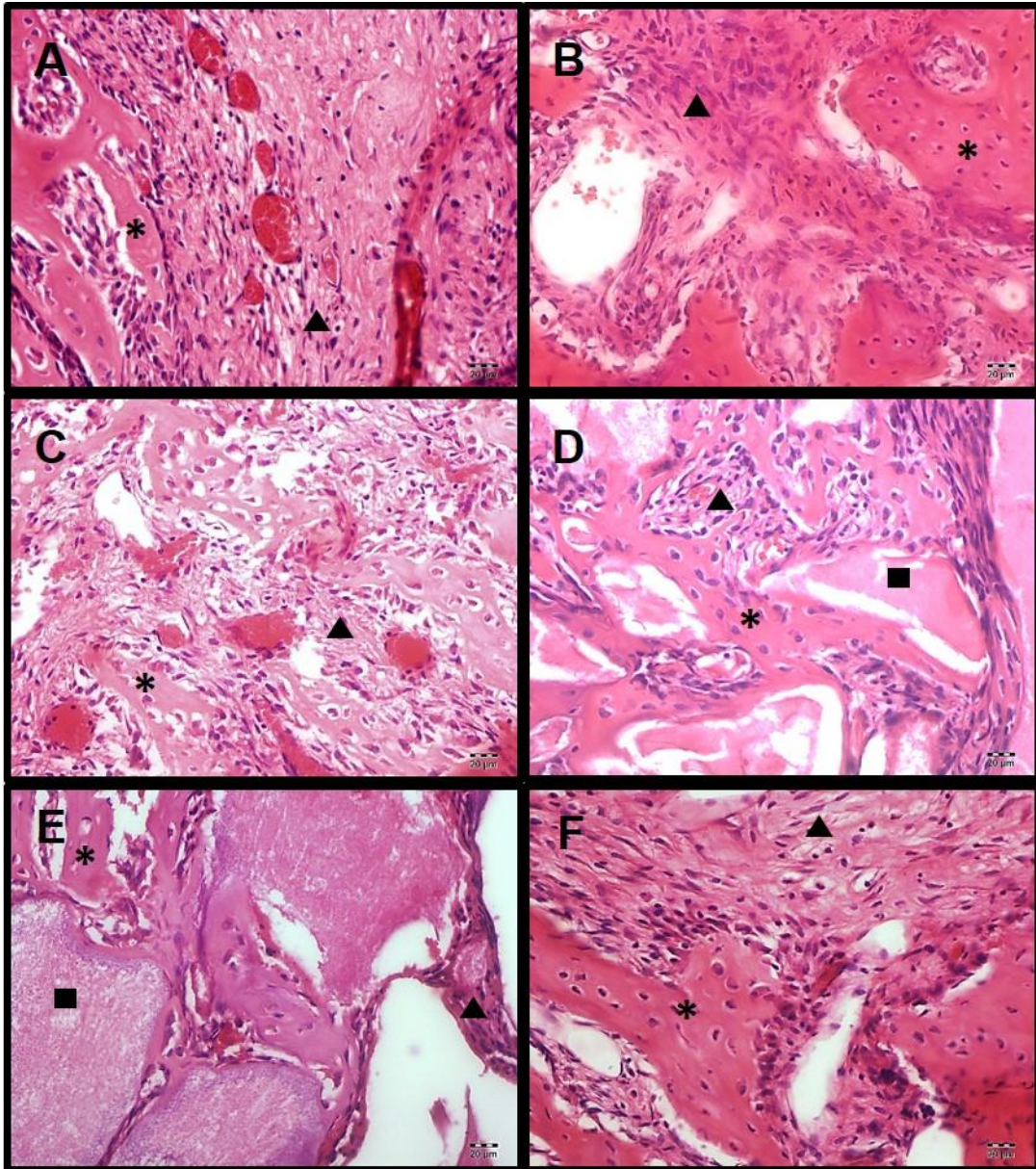


Figura 28. Fotomicrografias representativas da parede externa dos alvéolos aos 14 dias (400x- HE). **A, B, C, D, E e F.** Grupo C14, CL14, OB14, OBL14, HA14, HAL14 respectivamente. Presença de osso neoformado (*), tecido conectivo (▲), material (■). EM **B, D e F** maior presença de osteoblastos

- Centro do alvéolo:

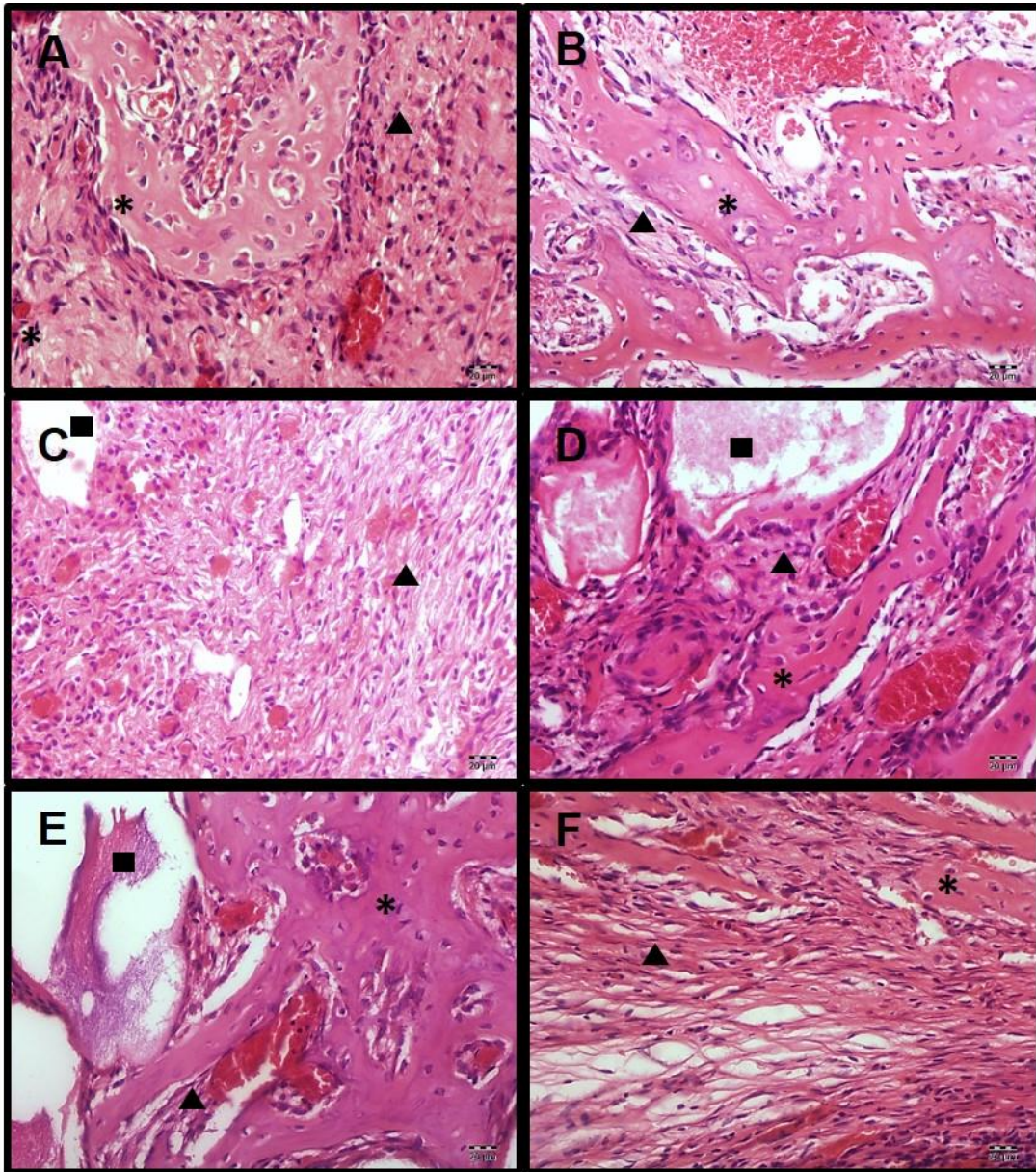


Figura 29. Fotomicrografias representativas da parede externa dos alvéolos aos 14 dias (400x- HE). **A, B, C, D, E e F.** Grupo C14, CL14, OB14, OBL14, HA14, HAL14 respectivamente. Presença de osso neoformado (*), tecido conectivo (▲), material (■). **B, D e E** mostram linhas cementantes no osso

5. 2. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Os resultados da análise histomorfométrica foram descritos por período de acompanhamento (7 e 14 dias) e as variáveis avaliadas foram agrupadas segundo o tipo de tecido: Tecido ósseo neoformado (matriz óssea, osteócitos, osteoblastos e osteoclastos- células polimorfonucleares) e tecido de granulação (células inflamatórias, fibroblastos/fibrócitos, matriz extracelular, vasos sanguíneos, hemácias fora do vaso).

5.2.1. TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO

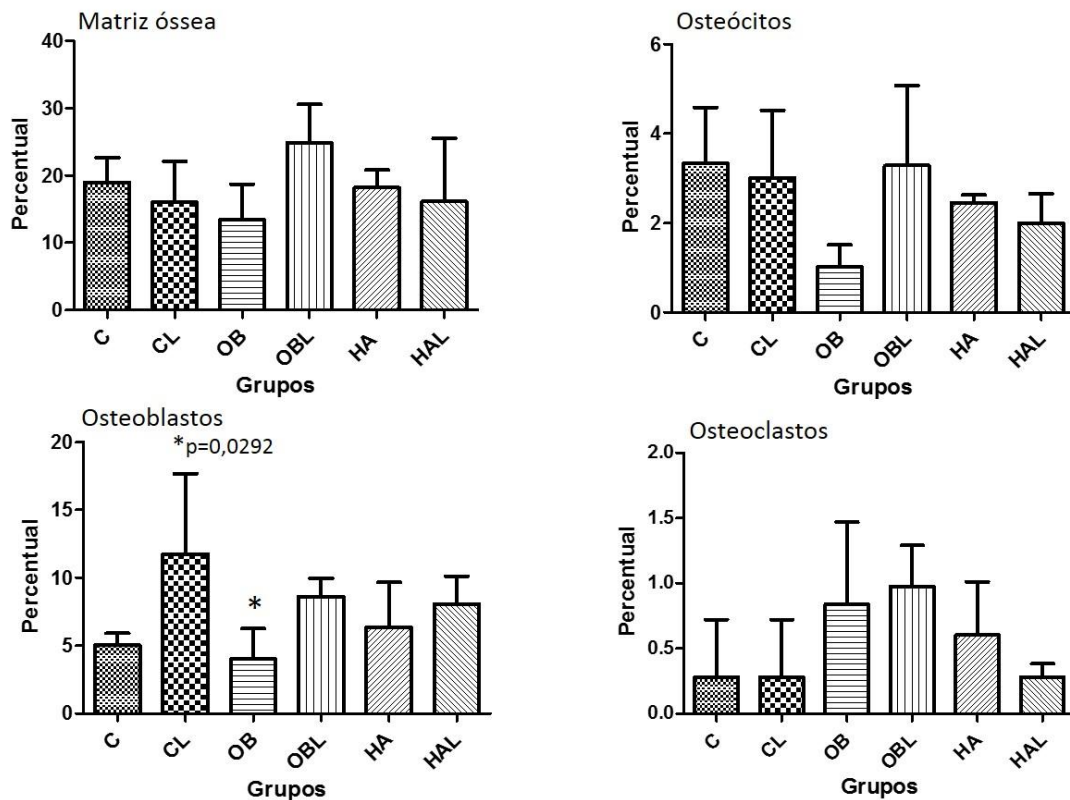


Gráfico 1. Média e desvio padrão dos percentuais dos componentes do tecido ósseo neoformado obtido pela análise histomorfométrica no período de 7 dias. C: coágulo, CL: coágulo + laser, OB: osso bovino inorgânico, OBL: osso bovino inorgânico + laser, HA: hidroxiapatita- β -fosfato tricálcico; HAL: hidroxiapatita- β -fosfato tricálcico + laser. **Matriz óssea:** diferença não significativa entre os grupos ($p=0,1726$). **Osteócitos:** diferença não significativa entre os grupos ($0,0791$). **Osteoblastos:** (*) diferença significativa ($p=0,0292$) entre os grupos CL vs. OB. **Osteoclastos:** diferença não significativa entre os grupos ($p=0,1023$).

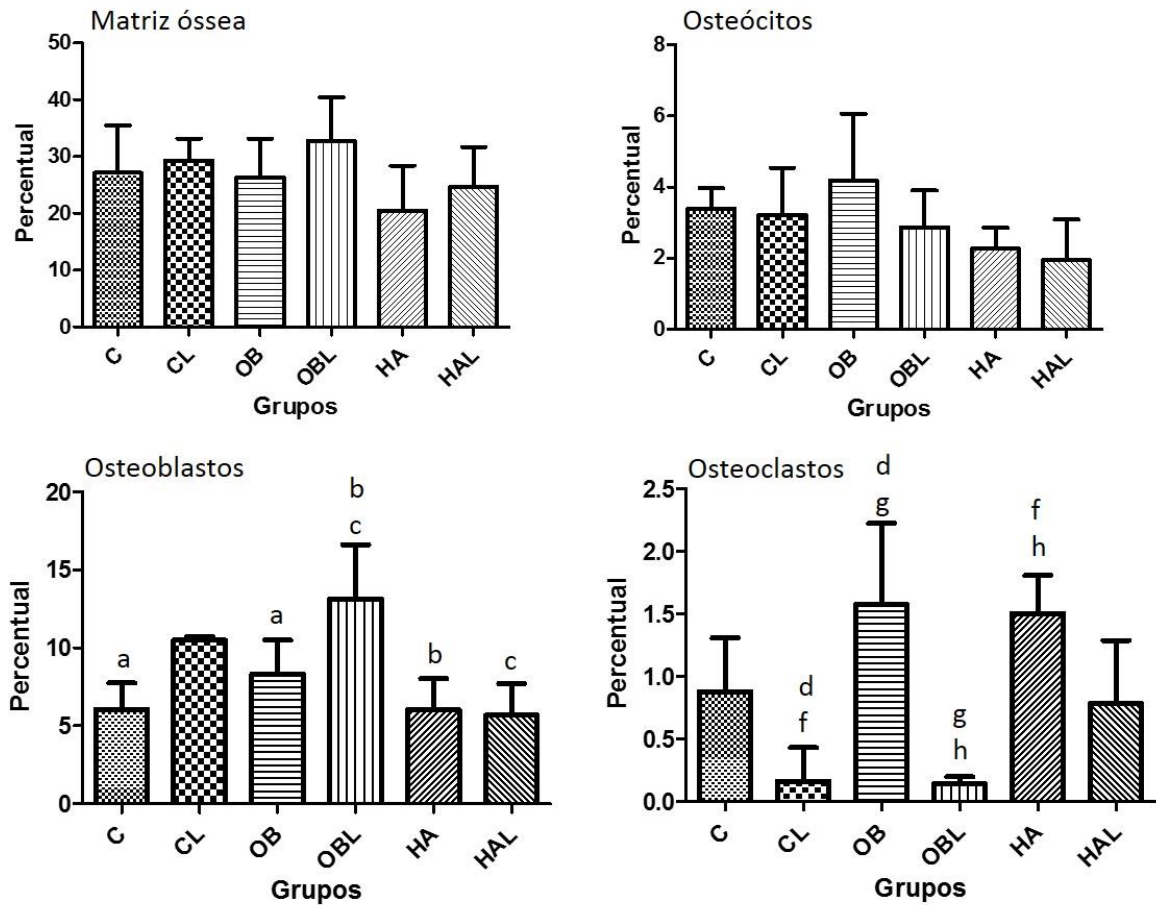


Gráfico 2. Média e desvio padrão dos percentuais dos componentes do tecido ósseo neoformado obtido pela análise histomorfométrica no período de 15 dias. C: coágulo, CL: coágulo + laser, OB: osso bovino inorgânico, OBL: osso bovino inorgânico + laser, HA: hidroxiapatita- β -fosfato tricálcico; HAL: hidroxiapatita- β -fosfato tricálcico + laser. **Matriz óssea:** diferença não significativa entre os grupos ($p=0,4498$). **Osteócitos:** diferença não significativa entre os grupos ($0,1447$). **Osteoblastos:** diferença significativa ($p=0,005$) entre os grupos CL vs. OB (a), OBL vs. HA (b), OBL vs. HAL (c). **Osteoclastos:** diferença significativa ($p=0,0002$) entre os grupos CL vs. OB (d), CL vs. HA (f), OB vs. OBL (g), OBL vs. HA (h)

5.2.2. TECIDO DE GRANULAÇÃO

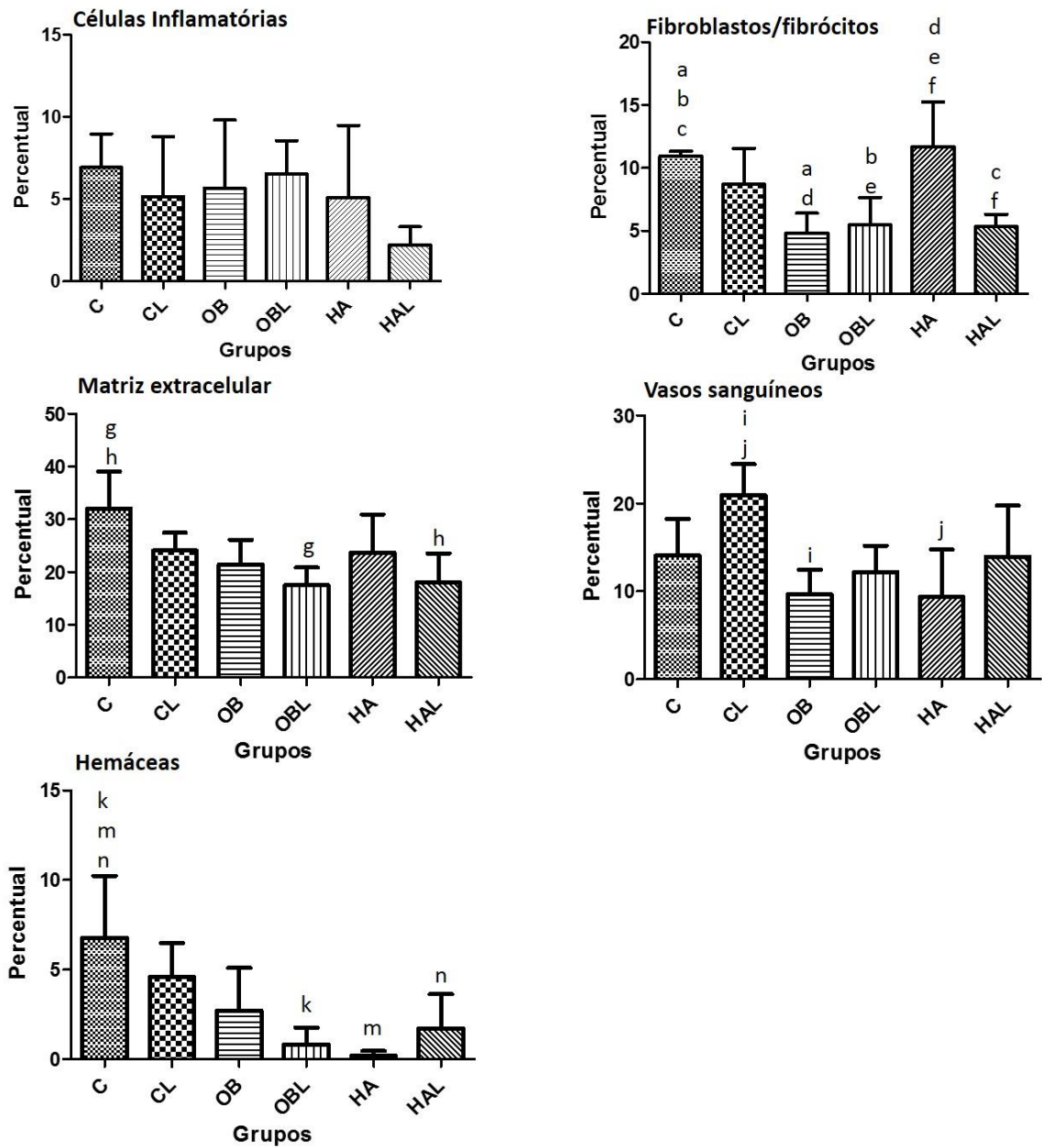


Gráfico 3. Média e desvio padrão dos percentuais dos componentes do tecido de granulação obtido pela análise histomorfométrica no período de 7 dias. C: coágulo, CL: coágulo + laser, OB: osso bovino inorgânico, OBL: osso bovino inorgânico + laser, HA: hidroxiapatita- β -fosfato tricálcico; HAL: hidroxiapatita- β -fosfato tricálcico + laser. **Células inflamatórias:** diferença não significativa entre os grupos ($p=0,3893$). **Fibroblastos/fibrócitos:** diferença significativa ($p=0,0006$) entre os grupos C vs. OB (a), C vs. OBL (b), C vs. HAL (c), OB vs. HA (d), OBL vs. HA (e), HA vs. HAL(f). **Matriz extracelular:** diferença significativa ($p=0,0157$) entre os grupos C vs. OBL (g) e C vs. HAL (h). **Vasos sanguíneos:** diferença significativa ($p= 0,0144$) entre os grupos CL vs. OB (i) e CL vs. HA (j). **Hemáceas:** diferença significativa ($p=0,0024$) entre os grupos C vs. OBL (k), C vs. HA (m), C vs. HAL (n).

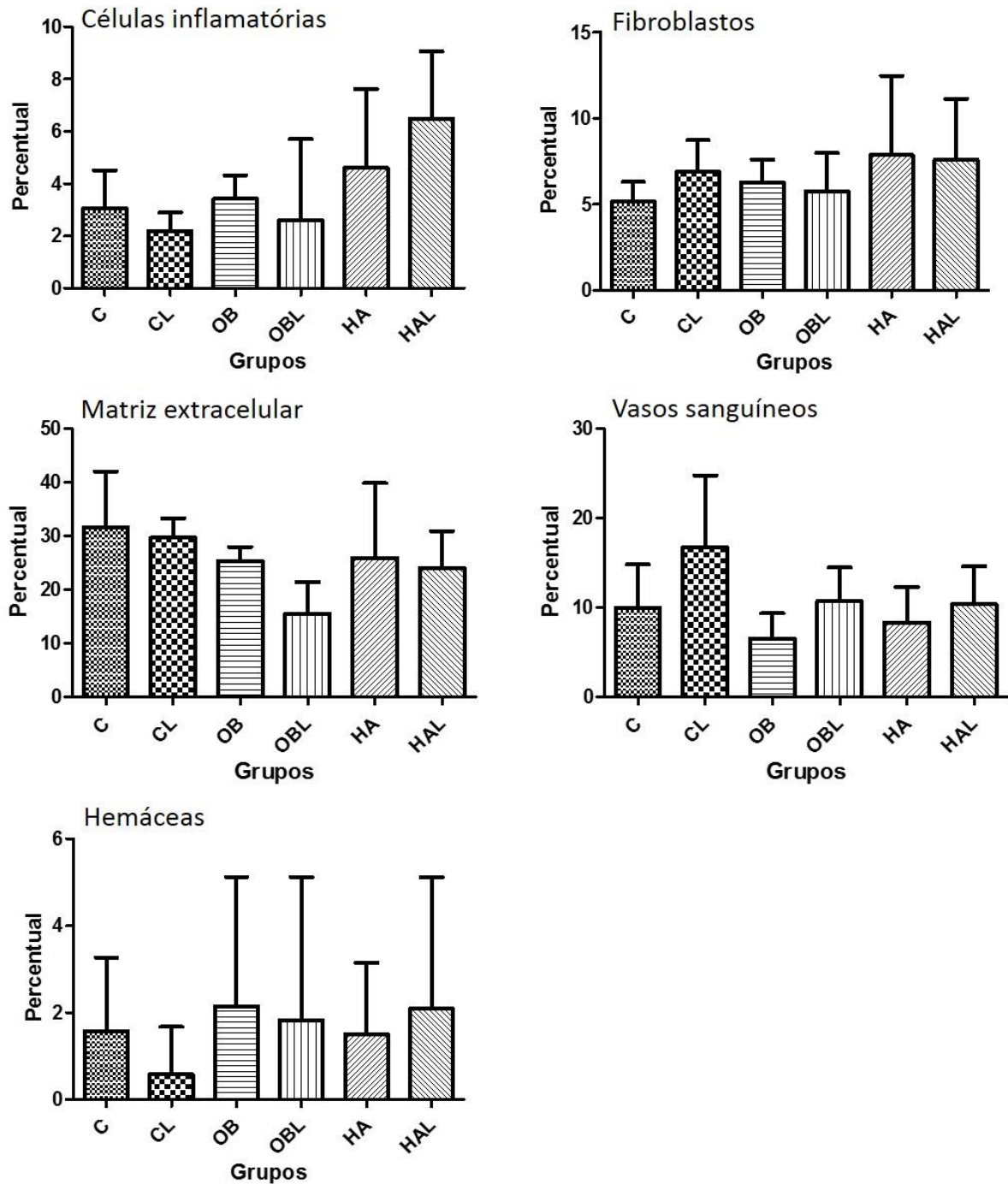


Gráfico 4. Média e desvio padrão dos percentuais dos componentes do tecido de granulação obtido pela análise histomorfométrica no período de 15 dias. C: coágulo, CL: coágulo + laser, OB: osso bovino inorgânico, OBL: osso bovino inorgânico + laser, HA: hidróxiapatita- β -fosfato tricálcico; HAL: hidróxiapatita- β -fosfato tricálcico + laser. **Células inflamatórias:** diferença não significativa entre os grupos ($p=0,1137$). **Fibroblastos/fibrócitos:** diferença não significativa entre os grupos ($p=0,7072$). **Matriz extracelular:** diferença não significativa entre os grupos ($p=0,1517$). **Vasos sanguíneos:** diferença não significativa entre os grupos ($p=0,1333$). **Hemáceas:** diferença não significativa entre os grupos ($p=0,9485$)

6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito da terapia de laser de baixa intensidade no reparo ósseo de alvéolos pós-exodontia tratados com dois biomateriais em ratos.

O processo do reparo ósseo alveolar tem sido avaliado em diversos tipos de animais, sendo os ratos os mais usados (Okamoto et al.⁹³ 1993; Park et al.⁹⁴ 2012; Park et al.⁸³ 2013), provavelmente porque o periodonto é semelhante, com exceção da presença da queratinização do epitélio sulcular e a cicatrização óssea é similar ao observado em humanos, e a cronologia do reparo no rato é compatível com a metade de tempo em humanos o que reduz o tempo do estudo (Huebsch,⁹⁵1958; Klausen,⁹⁶ 1991). Além disso, são animais de baixo custo, de fácil manipulação, econômica manutenção e alimentação (Gulinelli et al.⁹⁷ 2008; Poi et al.⁹⁸ 2007).

Estudos sobre reparo ósseo de alvéolo dentário tem sido amplamente pesquisado na busca da compreensão da biologia do osso (Cardaropoli, Araújo, Lindhe,³⁴ 2003; Araújo, Lindhe,³⁵ 2005) e é um modelo adequado para a avaliação da regeneração óssea já que todo trauma ocorrido ativa a regeneração local (Schenk et al.⁹⁹1994). Similar ao que acontece no humano, o ligamento periodontal fornece uma fonte de células pluripotentes que podem se diferenciar nas células encarregadas da cicatrização do alvéolo (Okamoto et al.⁹³ 1993).

Com respeito aos tipos de análise, existem muitos estudos que avaliam o reparo ósseo mediante microscopia óptica (Soares et al.⁸⁸ 2014; Pinheiro et al.¹⁰⁰ 2009; Pinheiro et al.¹⁰¹ 2003), histomorfometria (Cunha et al.⁸⁹ 2014; Pereira et al.⁹² 2007), imuno-histoquímica (Marques et al.¹⁰² 2015; Bigueti et al.¹⁰³ 2012) ou testes biomecânicos (Luger et al.¹⁰⁴ 1998). No presente trabalho as avaliações foram mediante estudo histológico e histomorfométrico,

Os períodos de avaliação escolhidos foram 7 e 14 dias para análises a curto e médio prazo. Nas fases iniciais do reparo ósseo acontece a proliferação e diferenciação das células e é nesse período onde o tecido poderia ser mais sensível ao efeito da TLBI (Torres et al.⁸⁶ 2008; Park et al.⁹⁴ 2012, Pinheiro et al.¹⁰⁵ 2012; Park et al.⁸³ 2013; Soares et al.⁸⁸ 2014, Tim et al.⁹¹ 2016).

Existem procedimentos que, segundo algumas pesquisas, podem estimular a cicatrização dos tecidos, como a terapia com laser em baixa intensidade. Alguns trabalhos que avaliam o reparo ósseo alveolar mostram seus efeitos positivos (Park

et al.⁹⁴ 2012; Park et al.⁸³ 2013; AboElsaad et al.¹⁰⁶ 2009) pois a TLBI atua na proliferação celular, na síntese de ATP e colágeno, e desencadeia a liberação de fatores de crescimento (Tu et al.¹⁰⁷ 2007).

O efeito da TLBI depende de múltiplos fatores, como o comprimento de onda, a potência, o tamanho do ponto, o tempo total de tratamento e a frequência. Por isso devemos determinar, cuidadosamente, os parâmetros para que não ocorra dano térmico ao aumentar a potência (Lomke,¹⁰⁸ 2009).

A luz com comprimentos de onda vermelho penetra 0,5 – 1mm antes de perder 37 % de sua intensidade, enquanto a infravermelha 2mm antes de perder o mesmo percentual de energia (Basford et al.¹⁰⁹ 1995). Em condições in vitro, o laser de baixa intensidade pode penetrar 18 mm em direção ao eixo do osso e 6 mm em sentido cortico-medular (Bossy,¹¹⁰ 1985). Barbosa et al. 2012, avaliaram defeitos irradiados com luz vermelha e infravermelha, e observaram um reparo mais avançado naqueles tratados no espectro infravermelho, podendo concluir que o uso da TLBI no infravermelho acelera a cicatrização e melhora a qualidade do osso neoformado. (Barbosa et al.¹¹¹ 2012). A TLBI parece ser mais efetiva na fase inicial da cicatrização e com irradiações repetidas (Coluzzi,¹¹² 2000).

O protocolo de terapia com laser em baixa intensidade utilizado neste trabalho foi baseado nos resultados satisfatórios de estudos prévios em animais (Tim et al.⁹¹ 2015; Korany et al.¹¹³ 2012) pois não existem protocolos definidos ou universalmente aceitos.

A entrega total de energia foi de 12J sendo distribuída em 4 períodos diferentes de 3J cada. A irradiação foi feita imediatamente após o procedimento cirúrgico (dia 0), no dia seguinte (dia 1), no terceiro (dia 3) e no quinto dia (dia 5) pós-operatório, pois estudos in vivo (Silva Jr. et al.¹¹⁴ 2002; Pinheiro et al.¹⁰¹ 2003, Tim et al.⁹¹ 2016, Hamad et al.¹¹⁵ 2016) detectaram diferenças na formação óssea quando a irradiação foi aplicada em células imaturas, na fase inicial de cicatrização.

Na TLBI, podem-se encontrar diferentes protocolos de irradiação, com diferentes materiais de ativação, comprimentos de onda, dose e número de aplicações o que dificulta a comparação de resultados e a determinação dos parâmetros pelo que se faz necessário pesquisas que possam direcionar um consenso.

Avaliar a ação conjunta destas terapias, enxertia e TLBI, justifica-se pelo fato de que os biomateriais são adequados osteocondutores, e a TLBI tem demonstrado que sua aplicação pode estimular a proliferação celular, e a secreção de fatores de crescimento (BMPs, PDGF e TGF- β). Estes achados nos permite supor que a associação entre tratamentos pode modular a reparação de defeitos ósseos de uma forma semelhante ao que ocorre após enxerto de osso autógeno, proporcionando propriedades osteoindutoras ao enxerto; também, poderia acelerar a reabsorção do biomaterial (Pinheiro et al.¹¹⁶ 2013).

O presente estudo registrou-se uma tendência na estimulação da TLBI na fase inicial do reparo ósseo, sugerida pela diferenciação celular osteoblástica e endotelial. Isto se suporta com o fato que aos 7 e 14 dias encontrou-se uma maior quantidade de vasos sanguíneos em todos os grupos irradiados.

Dentre os mecanismos subjacentes à estimulação do reparo ósseo temos à promoção da angiogênese (Oron et al.¹¹⁷ 2001), produção de colágeno (Ayuk et al.¹¹⁸ 2012), proliferação e diferenciação celular osteogênica (Yaakobi et al.¹¹⁹ 1996).

A ativação da neo-angiogênese na área injuriada, produto da bioestimulação da TLBI, aumenta o oxigênio nos tecidos promovendo a mitose celular (Skopin et al.¹²⁰ 2009); além de ser necessário para a reabsorção do tecido necrótico. Tim et al demonstrou que a TLBI incrementou os níveis de genes angiogênicos sugerindo uma regulação positiva do FGF e do PDGF (Tim et al.⁹¹ 2016). Um estudo clínico mostra como a TLBI promove a neo-angiogênese após exodontia em pacientes infectado com HIV (Halon et al.¹²¹ 2015). Diversos estudos em animais reforçam este achado (AboElsaad et al.¹⁰⁶ 2009; Barbosa et al.¹¹¹ 2012).

Além disso, observou-se maior número de osteoblastos nos grupos tratados com TLBI aos 7 dias; mas somente houve diferença significativa entre os grupos CL7 (coágulo + TLBI) e OB7 (osso bovino inorgânico). Aos 14 dias, houve maior presença de matriz óssea sugerindo, portanto, maior formação óssea; porém a área de osso neo-formado não foi medida neste estudo. Diversos estudos concluem que a TLBI associada a biomateriais (Barbosa et al.¹¹¹ 2012; Cunha et al.⁸⁹ 2014; Soares et al.⁸⁸ 2014; Rasouli et al.¹²² 2014) ou não promove a proliferação e maturação de osteoblastos (Ozawa et al.¹²³ 1998; Park et al.⁹⁴ 2012; Park et al.⁸³ 2013, Jawad et al.¹²⁴ 2013; Gonzalez et al.¹²⁵ 2015; Romão et al.¹²⁶ 2015; Hamad et al.¹¹⁵ 2016), pois

atua como um fator indutor estimulando às células mesenquimais a se diferenciarem em osteoblastos; AboElsaad et al. encontraram diferenças na quantidade de osteoblastos entre o grupo irradiado e não irradiado em defeitos na mandíbula de ratos que foram preenchidos com biovidro (AboElsaad et al.¹⁰⁶ 2009).

Além disso, foi descrito que os grupos que receberam a terapia mostraram linhas cimentantes o que nos indica uma fase de maturação mais avançada comparados com os não irradiados. Este achado concorda com o resultado de Soares et al 2014 que indicaram que a TLBI associada à HA+BTCP resultou um estágio mais avançado do reparo ósseo (Soares et al. 2014).

Ao contrário desses resultados, Bouvet-Gerbetaz et al. 2009 concluíram que a TBLI não estimulou a proliferação ou diferenciação celular, mas isto depende dos parâmetros utilizados (Bouvet-Gerbetaz et al.¹²⁷ 2009). Apesar dos possíveis benefícios da TBLI, atualmente, ainda não existem protocolos estabelecidos e aceitos para aplicação clínica, motivo pelo qual são necessários estudos clínicos que conduzam na criação dos mesmos.

Embora a análise histomorfométrica mostrou uma tendência do benefício da TBLI, mostrando ainda que algumas correlações foram estatisticamente significantes, estas não foram suficientemente consistentes para todos os grupos irradiados quando comparados aos não irradiados nas três situações. Isto nos leva a supor que a energia utilizada no tratamento poderia ter sido maior (e não a mínima requerida) para garantir a suficiente penetração da luz através do biomaterial e tecidos, e assim atingir no osso em ditos casos, considerando, especialmente, que o sucesso da TBLI depende da escolha dos parâmetros de aplicação.

7. CONCLUSÃO

Dentro dos limites do estudo e da metodologia utilizada podemos concluir que:

A terapia de laser de baixa intensidade teve uma tendência na bioestimulação na fase inicial do reparo ósseo do alvéolo após exodontia e dos tratados com HA + TCP e OBI.

8. REFERÊNCIAS

1. Moreira R da S, Nico LS, Tomita NE, Ruiz T. Oral health of Brazilian elderly: a systematic review of epidemiologic status and dental care access. *Cad Saude Publica*. 2005;21(6): 1665-75.
2. Reich KM, Huber CD, Lippnig WR, Ulm C, Watzek G, Tangl S. Atrophy of the residual alveolar ridge following tooth loss in an historical population. *Oral Dis*. 2011;17(1):33-44.
3. Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc* 1960;61:32-44
4. Atwood DA. Some clinical factors related to the rate of resorption of residual ridges. *Journal of Prosthetic Dentistry* 1962; 12: 441-450.
5. Atwood DA. Postextraction changes in the adult mandibule as illustrated by microradiographs of midsagittal section and serial cephalometric roentgenograms. *Journal of Prosthetic Dentistry* 1963; 13: 810-816.
6. Johnson K. A study of the dimensional changes occurring in the maxilla after tooth extraction. Part I. Normal Healing. *Australian Dental Journal*. 1963;8:241-244
7. Johnson K. A study of the dimensional changes occurring in the maxilla following tooth extraction. *Aust Dent J* 1969; 14: 428-433.
8. Carlsson GE, Thilander H, Hedegard B. Histological changes in the upper alveolar process after extraction with or without insertion of an immediate full denture. *Acta Odontológica Scandinava*.1967; 25: 21-43.
9. Pietrokovski J, Massler M. Alveolar ridge resorption following tooth extraction. *J Prosthet Dent* 1967; 17: 21-27.
10. Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003; 23: 313-323.
11. Tan WL, Wong TLT, Wong MCM, Lang NP. A systematic review of post-

- extractional alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. *Clin. Oral. Impl. Res.* 23 (Suppl. 5), 2012, 1–21.
12. Lekovic, V., Kenney, E.B., Weinlaender, M., Han, T., Klokkevold, P., Nedic, M. & Orsini, M. A bone regenerative approach to alveolar ridge maintenance following tooth extraction. Report of 10 cases. *Journal of Periodontology*. 1997; 68: 563–570
 13. Lekovic, V., Camargo, P.M., Klokkevold, P.R., Weinlaender, M., Kenney, E.B., Dimitrijevic, B. & Nedic, M. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. *Journal of Periodontology*. 1998; 69: 1044–1049.
 14. Camargo, P.M., Lekovic, V., Weinlaender, M., Klokkevold, P.R., Kenney, E.B., Dimitrijevic, B., Nadic, M., Jancovic, S. & Orsini, M. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontology*. 2000; 90: 581–586.
 15. Serino, G., Biancu, S., Iezzi, G. & Piattelli, A. Ridge preservation following tooth extraction using a polylactide and polyglycolide sponge as space filler: a clinical and histological study in humans. *Clinical Oral Implants Research*. 2003; 14: 651–658.
 16. Iasella, J.M., Greenwell, H., Miller, R.L., Hill, M., Drisko, C., Bohra, A.A. & Scheetz, J.P. 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. *Journal of Periodontology*. 2003; 74: 990–999.
 17. Pelegrine, A.A., da Costa, C.E., Correa, M.E. & Marques, J.F. Jr (2010) Clinical and histomorphometric evaluation of extraction sockets treated with an autologous bone marrow graft. *Clinical Oral Implants Research* 21: 535–542
 18. Mc Allister BS. Haghghat K. Bone Augmentation Techniques. *J Periodontol* 2007; 78:377-396
 19. Esposito M, Grusovin MG, Felice P, Karatzopoulos G, Worthington HV, Coulthrad P. The Efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants- a Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol* 2009;2(3)167-184.
 20. Aloy-Prósper A, Maestre-Ferrín L, Peñarrocha-Oltra D, Peñarrocha-Diago M. Bone regeneration using particulate grafts: An update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16(2): 210-214.

21. Horváth A, Mardas N, Mezzomo LA, Needleman IG, Donos N. Alveolar ridge preservation: A systematic review. *Clin Oral Invest* 2013;17:341–363.
22. Fukuoka H, Daigo Y, Enoki N, Taniguchi K, Sato H. Influence of carbon dioxide laser irradiation on the healing process of extraction sockets. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2011; 69: 33–40
23. Chen S.T, Beagle J, Storgard S, Chiapasco M, Darvi I. Consensus Statement And Recommended Clinical Procedures Regarding Surgical Techniques. *J Oral Maxillofac Implants* 2009; 24(SUPPL):272–278.
24. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001;10 (2):96-101.
25. Weinfeld I, Magalhães LV, Magalhães J, Villa N. Histologic study of new material (Biobone) indicated to bone regeneration. *Rev Paul Odontol*.1999;21(4):8-10.
26. Nevins M. Camelo M. De Paoli S, et al. A study of the fate of the buccal Wall of extraction sockets of teeth with prominent roots. *Int J Periodontics restorative Dent* 2006;26:19-29
27. Araujo MG, Linder E, Lindhe J. Bio-Oss Collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6 months study in the dogs. *Clinical Oral Implant Research* 2011;22: 645-652
28. Wang RE, Lang NP. New insights into ridge preservation after tooth extraction. *Clin. Oral Implants Res*. 23(Suppl. 6), 2012, 147–156
29. Crespi, R., Cappare, P. & Gherlone, E. Magnesium-enriched hydroxyapatite compared to calcium sulfate in the healing of human extraction sockets: radiographic and histomorphometric evaluation at 3 months. *Journal of Periodontology*. 2009; 80: 210–218.
30. Vignoletti, F., Matesanz, P., Rodrigo, D., Figuero, E., Martin, C. & Sanz, M. Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. *Clinical Oral Implants Research* 2012; 23(Suppl. 5): 22–38.
31. Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidates faster with low power laser. *Lasers Surg Med* 1987;7(1): 36-45.
32. Coombe AR, Ho CT, Darendeliler MA, Hunter N, Phillips JR, Chapple CC, Yum LW. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod Res* 2001;4(1):3-14.

33. Nicola RA, Jorgeti V, Rigau J, Pacheco MT, dos Reis LM, Zangero RA. Effect of low power GaAlAs laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci* 2003; 18(2):89-94.
34. Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2003; 30:809–818
35. Araujo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 212–218
36. Discepoli N, Vignoletti F, Laino L, de Sanctis M, Muñoz F, Sanz M. Early healing of the alveolar process after tooth extraction. An experimental study in the beagle dog. *J Clin Periodontol* 2013; 40: 638–644.
37. Reis-Filho CR, Silva ER, Martins AB, Pessoa FF, Gomes PV, de Araújo MS, Miziara MN, Alves JB. *Arch Oral Biol.* 2012 May;57(5):469-76
38. Scala A, Lang NP, Schweikert MT, de Oliveira JA, Rangel-Garcia I Jr, Botticelli D. Sequential healing of open extraction sockets. An experimental study in monkeys. *Clin. Oral Impl. Res.* 25, 2014, 288–295
39. Tamae PE. Avaliação da neoformação óssea do alvéolo dentário com plasma rico em plaquetas (PRP) em coelhos (*Oryctolagus Cuniculus*) 2005. 91f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2005.
40. Johansen JR, Gilhuus-Moe O. Repair of the postextraction alveolus in the guinea pig: a histological and radiographic study. *Act Odont Scand.*v27, n.1, p.249-58, 1969.
41. Barone A, Toti P, Piattelli A, Iezzi G, Derchi I, Covani U. Extraction Socket Healing in Humans After Ridge Preservation Techniques: Comparison Between Flapless and Flapped Procedures in a Randomized Clinical Trial. *J Periodontol* 2014;85:14-23.
42. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 200, n. 2, p.165-170, 1992.
43. Sato H, Takeda Y. Proliferative activity, apoptosis, and histogenesis in the early stages of rat tooth extraction wound healing. *Cells Tissues Organs* 2007; 186: 104–111

44. Trombelli L, Farina R, Marzola A, Bozzi L, Liljenberg B, Lindhe J. Modeling and remodeling of human extraction sockets. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 630–639
45. Lin WL, McCulloch CA, Cho MI. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anat Rec* 1994; 240: 492–506.
46. Farina R, Trombelli L. Wound healing of extraction sockets. *Endodontic Topics* 2012; 25:16-43
47. Guastaldi AC, Aparecida AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quim Nova* 2010;33(6):1352-8
48. Kao ST, Scott DD. A review of bone substitutes. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2007 Nov;19(4):513-21
49. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005 Nov;36 Suppl 3:S20–27
50. Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg.* 2005 Jan-Feb;13(1):77-86.
51. Sanada JT, Rodrigues JGR, Canova GC, et al. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. *J Appl Oral Sci*, v. 11, n. 3, p. 209-215, 2003.
52. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 2002;(395):81–98. 11.
53. Shirakata Y, Setoguchi T, Machigashira M, Matsuyama T, Furuichi Y, Hasegawa K, et al. Comparison of injectable calcium phosphate bone cement grafting and open flap debridement in periodontal intrabony defects: a randomized clinical trial. *J Periodontol* 2008; 79:25- 32;
54. Aghaloo TL, Moy PK. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement? *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007;22:49–70
55. Al-Nawas B, Schiegnitz E. Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone - a systematic review and meta-analysis. *Eur J Oral Implantol.* 2014;7(2):219-34
56. Nkenke E, Stelzle F. Clinical outcomes of sinus floor augmentation for implant placement using autogenous bone or bone substitutes: a systematic review.

- Clin Oral Implants Res 2009;20:124–133
57. Klein MO, Al-Nawas B. For which clinical indications in dental implantology is the use of bone substitute materials scientifically substantiated? *Eur J Oral Implantol* 2011;4:11–29.
 58. Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, Heiland M, Wolff KD, Smeets R. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials. *J Craniomaxillofac Surg* 2012;40:706–718.
 59. Rogers GF, Greene AK. Autogenous bone graft: basic science and clinical implications. *J Craniofac Surg* 2012;23(1):323-7.
 60. Aitasalo KM, Peltola MJ. Bioactive glass hydroxyapatite in fronto-orbital defect reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 2007;120(7):1963-72.
 61. Tadjoeidin ES, de Lange GL, Brinckers AL, Burger EH. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective histomorphometrical study of five cases. *Journal of clinical periodontology* 2003;30(3):261-270
 62. Barone A, Crespi R, Aldini NN, Fini M, Giardino R, Covani U. Maxillary sinus augmentation: Histologic and histomorphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:519-525.
 63. Orsini G, Scarano A, Piattelli M, Piccirilli M, Caputi S, Piattelli A. Histologic and ultrastructural analysis of regenerated bone in maxillary sinus augmentation using a porcine bone-derived biomaterial. *J Periodontol* 2006;77:1984-1990.
 64. Zitzmann NU, Schaerer P, Marinello CP, Schupbach P, Berglund T. Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: A histologic study in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001;21:288-295.
 65. Barone A, Aldini N, Fini M, Giardino R, Calvo Guirado L, Covani U. Xenograft Versus Extraction Alone for Ridge Preservation After Tooth Removal: A Clinical and Histomorphometric Study. *J Periodontol* 2008;79:1370-1377.
 66. Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss: an experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*. 1997;8(2):117–124
 67. Hammerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Implant Research* 1998;9(3):151-62

68. Lindhe J, Cecchinato D, Donati M, Tomasi C, Liljenberg B. Ridge preservation with the use of deproteinized bovine bone mineral. *Clin. Oral Impl. Res.* 00, 2013, 1–5
69. Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann BoneCeramic, Bio-Oss, Puros, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clinical Oral Implants Research.* 2013; 24 (5):576–585
70. Ohayon L. Ridge enlargement using deproteinized bovine bone and a bioresorbable collagen membrane: a tomographic, histologic, and histomorphometric analysis. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry.* 2011; 31(3): 237–245
71. Traini T, Degidi M, Sammons R, Stanley P, Piatelli A. Histologic and elemental microanalytical study of anorganic bovine bone substitution following sinus floor augmentation in humans. *Journal of Periodontology* 2008;79(7):1232-40
72. Traini T, Valentini P, Iezzi G, Piatelli A. A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. *Journal of Periodontology* 2007;78(5):955-61
73. Shue L, Yufeng Z, Mony U. Biomaterials for periodontal regeneration. *Biomater.* 2012;2(4):271-277
74. JX Lu, Gallur A, Flautre B, Anselme K, Descamps M, Thierry B, et al. Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits. *J Biomed Mater Res* 1998; 42:357-67
75. Bae JH, Kim YK, Kim SG, Yun PY, Kim JS. Sinus bone graft using new alloplastic bone graft material (Osteon)-II: clinical evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:14–20.
76. Covani U, Orlando B, Giacomelli L, Cornelini R, Barone A. Implant survival after sinus elevation with Straumanns BoneCeramic in clinical practice: ad-interim results of a prospective study at a 15-month follow-up. *Clin Oral Implants Res* 2011;22:481–484.
77. De Coster P, Browaeys H, De Bruyn H. Healing of extraction sockets filled with BoneCeramic® prior to implant placement: preliminary histological findings. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2011 Mar;13(1):34-45.
78. Lindgren C, Mordenfeld A, Johansson CB, Hallman M. A 3-year clinical follow-

- up of implants placed in two different biomaterials used for sinus augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2012;27:1151–1162.
79. Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(7):688-98
 80. Ebrahimi T, Moslemi N, Rokn AR, Heidari M, Nokhbatolfoghahaie, H, Fekrazad R. The influence of Low-Intensity Laser Therapy on bone healing. *Journal of Dentistry of Tehran University of Medical Sciences.* 2012; 9(4):238-48.
 81. Pinheiro AL, Brugnera A., Zanin F. *Aplicação do Laser na Odontologia.* São Paulo: Santos, 2010. 428 p.
 82. Tajali SB, MacDermid JC, Houghton P, Grewal R. Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research.* 2010; 5(1).
 83. Park JJ, Kang KL. Effect of 980-nm GaAlAs diode laser irradiation on healing of extraction sockets in streptozotocin-induced diabetic rats: a pilot study. *Lasers Med Sci* (2012) 27:223–230
 84. Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surgery Medicine.* 2005;36:307–14
 85. Lopes CB, Pacheco MTT, Silveira Junior L. The effect of the association of near infrared laser therapy, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with internal rigid fixation: A Raman spectroscopic study. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2010;4(4):1257-63
 86. Torres CS, Santos JN, Monteiro JSC. Does the Use of Laser Photobiomodulation, Bone Morphogenetic Proteins, and Guided Bone Regeneration Improve the Outcome of Autologous Bone Grafts? An in Vivo Study in a Rodent Model. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2008;26(4):371-377
 87. Pinheiro ALB, Soares LGP, Aciole GTS. Light microscopic description of the effects of laser phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration in a rodent model. *Journal of Biomedical Material Research part A.* 2011;98(2):212-21.
 88. Soares LGP, Marques AMC, Guarda MG, Aciole JMS, Santos JN, Pinheiro

- ALB. Influence of λ 780 nm laser light on the repair of surgical bone defects grafted or not with biphasic synthetic micro-granular hydroxylapatite + Beta-Calcium triphosphate. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2014;131:16-23.
89. Cunha MJS, Esper LA, Sbrana MC, Oliveira PGFP, Valle AL, Almeida ALPF. Effect of low-level laser on bone defects treated with bovine or autogenous bone grafts: in vivo study in rat calvaria. *BioMed Research International*. 2014. ID 104230. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/104230>
 90. Brawn PRB, Kwong-Hing A. Histologic comparison of light emitting diode phototherapy-treated hydroxyapatite-grafted extraction sockets: a same-mouth case study. *Implant Dentistry*. 2007;16(2):204-11.
 91. Tim CR, Bossini PS, Kido HW, Malavazi I, Kress MR, Carazzolle MF, Parizotto NA, Rennó AC. Effects of low level laser therapy on inflammatory and angiogenic gene expression during the process of bone healing: A microarray analysis. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 2016;154:8-15.
 92. Pereira MC, Zecchin K, Campagnoli EB, Jorge J. Ovariectomy Delays Alveolar Wound Healing After Molar Extractions in Rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65:2248-2253
 93. Okamoto T, Niccou-Filho WO. Efeitos da radiação laser do tipo hélio-neônio verde (550 nm) no processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. *rev. Odontol. UNESP, São Paulo*, 22(2): 213-221, 1993
 94. Park JB, Ahn SJ, Kang YG, Kim EC, Heo JA, Kang KL. Effects of increased low-level diode laser irradiation time on extraction socket healing in rats. *Lasers in Medical Science*. 2013; Feb;30(2):719-26
 95. Huebsch RF. Clinical and histological study of alveolar osteitis. *J Oral Surg Anesth Hosp Dent Serv* 1958; 16(6):473-82
 96. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* 1991;62:59-73
 97. Gulinelli JL, Panzarini JR, Fattach CM, Poi WR, Sonode CK, Negri MR, Saito CT. Effect of root surface treatment with propolis and fluoride in delayed tooth replantation. *Dent Traumatol* 2008;24(6):651-7
 98. Poi WR, Carvalho RM, Panzarini SR, Sonoda Ck, Manfrin TM, RodriguesTda S. Influence of enamel matrix derivative (endogain) and sodium fluoride on the healing process in delayed tooth replantation: Histologic and histometric

- analysis in rats. *Dent Traumatol* 2007;23(1):35-41
99. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1994;9(1):13-29
 100. Pinheiro, A. L. B.; Gerbi, M. E. M. M.; Limeira junior, F. A.; et al. Bone repair following bone grafting hydroxyapatite, guided bone regeneration and infrared laser photobiomodulation: a histological study in a rodent model. *Lasers in Medical Science*, v. 24, p. 234-240, 2009
 101. Pinheiro AI, Limeira Junior Fde A, Gerbi ME, Ramalho LM, Marzola C, Ponzi EA. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with the inorganic bovine bone. *Brazilian Dental Journal* 2003;14(3):177-181.
 102. Marques L, Holgado L, Francischone LA, Ximenez JPB, Okamoto R, Kinoshita A. New LLLT protocol to speed up the bone healing process—histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. *Lasers Med Sci* (2015) 30:1225–1230
 103. Biguetti CC, Marquadt EJ, Andrade, Caviquioli G, Moreschi E, Comparin E, Matsumoto MA. Effect of Low-Level Laser Therapy on Intramembranous and Endochondral Autogenous Bone Grafts Healing. *Microsc. Res. Tech.* 2012;75:1237–1244.
 104. Luger EJ, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekel S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers in Surgery and Medicine*. 1998;22(2):97 -102.
 105. Pinheiro A.L.B., Soares L.G.P., Barbosa A.F.S., Ramalho L.M.P., Santos J.N. Does LED phototherapy influence the repair of bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration? A description of the repair process on rodents, *Lasers Med. Sci.* 2012a;27: 1013–24.
 106. AboElsaad N, Soory M, Gadalla L, Ragab L, Dunne S, Zalata K, Louca C. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of bone defects (an experimental study). *Lasers Med Sci.* 2009; 24:527–533
 107. Tu Q, Zhang J, James L, Dickson J, Tang J, Yang P, Chen J. Cbfa1/Runx2-deficiency delays bone wound healing and locally delivered Cbfa1/Runx2 promotes bone repair in animal models. *Wound Repair Regen.* 2007; 15:404–412
 108. Lomke MA. Clinical applications of dental lasers. *Gen Dent.* 2009;57:47–59

109. Basford JR. Low-intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med* 1995;16:331-342
110. Bossy I, Chevalier JM, Sambuc P. In vitro survey of low energy laser beam penetration in compact bone. *Acupunct Electrother Res* 1985;10:35–39
111. Barbosa D, de Souza R, Xavier M, da Silva FF, Arisawa EA, Villaverde A. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on bone repair in rats: optical densitometry analysis. *Lasers in Medical Science* 2013;(28) 2:651–656
112. Coluzzi DJ. An overview of laser wavelengths used in dentistry. *Dent Clin North Am.* 2000;44:753–765
113. Korany NS, Mehanni SS, Hakam , El-Maghraby EMF. Evaluation of socket healing in irradiated rats after diode laser exposure (histological and morphometric studies). *Archives of oral biology.* 2012;57:884-891.
114. Silva Junior AN, Pinheiro ALB, Oliveira MG, Weismann R, Ramalhho PLM, Nicolau RA. Computerized morphometric assessment of the effect of low level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *J Clin Laser Med Surg* 2004; 20: 83-87. doi:10.1089/104154702753768061
115. Hamad SA, Naif JS, Abdulah MA. Effect of diode laser on healing of tooth extraction socket: An experimental study in rabbits. *J Maxillofac Oral Surg.* 2016;15(3):308-314.
116. Pinheiro A.L.B., Aciole G.T.S., Ramos T.A., Gonzalez T.A., Silva LN, Soares LGP, Aciole JMS, Santos JN. The efficacy of the use of IR laser phototherapy associated to biphasic ceramic graft and guided bone regeneration on surgical fractures treated with miniplates: a histological and histomorphometric study on rabbits, *Lasers Med. Sci.* 2013; 29(1): 279–288.
117. Oron U, Yaakobi T, Oron A, Hayam G, Gepstein L, Rubin o, Wolf T, Ben Haim S. Attenuation of infarct size in rats and dogs after myocardial infarction by low-energy laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2001; 28(3):204-211.
118. Ayuk Sm, Houreld NN, Abrahamse H. Collagen production in diabetic wounded fibroblasts in response to low-intensity laser irradiation at 660nm. *Diabetes Technol Ther.* 2001;14(12):1110-1117.
119. Yaakobi T, Maltz L, Uoron U. Promotion of bone repair in the cortical bone of the tibia in rats by low energy laser (He-Ne) irradiation. *Calcif Tissue Int.* 1996;59(4):297-300.
120. Skopin MD, Molitor SC. Effects od near-infrared laser exposure in a cellular

- model of wound healing. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2009;25:75-80
121. Halon A, Donizy P, Dziegala M. Tissue laser bioestimulation promotes post-extraction neoangiogenesis in HIV-infected patients. *Lasers Med Sci*. 2015;30:701-706.
 122. Rasouli AAG, Reza AR, Kalhori KAM, Khorsand A, Pinheiro ALB, Fekrazad R. Effect of low-level laser therapy irradiation and Bio-Oss graft material on the osteogenesis process in rabbit calvarium defects: a double blind experimental study. *Lasers Med Sci*. 2014;29:925-932
 123. Ozawa YSN, Kariya G, Abiko Y. Low energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cell. *Bone*. 1998;22:347-354.
 124. Jawad MM, Husein A, Azlina A, Alam MK, Hassan R, Shaari R. Effect of 940nm low-level laser therapy on osteogenesis in vitro. *Journal of Biomedical Optics*. 2013;18(12):128001
 125. Sella VRG, Costa do Bonfim FR, Machado PCD, Morsoleto MJMS, Chohfi M, Plapler H. Effect of low-level laser therapy on bone repair: a randomized controlled experimental study. *Lasers Med Sci*. 2015;30:1061-1068.
 126. Romão MMA, Marques MM, Cortes ARG, Horliana ACRT, Moreira MS, Lascala CA. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of human alveolar bone repair induced by laser phototherapy: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44:1521-1528.
 127. Bouvet-Gerbettaz S, Meriga E, Rocca JP, Carle GF, Rochet N. Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into Osteoblasts and Osteoclasts. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2009;41:291-297.