

ANDRÉ LUIZ MARINHO FALCÃO GONDIM

**EFEITO DA LASERTERAPIA SOBRE A OSTEOGÊNESE EM DEFEITOS
PREENCHIDOS COM CIMENTO DE α -TCP E GRÂNULOS DE β -TCP/HA
CONFECCIONADOS EM CALOTA CRANIANA DE RATOS**

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Doutor em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli

Porto Alegre

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G637e Gondim, André Luiz Marinho Falcão
Efeito da laserterapia sobre a osteogênese em
defeitos preenchidos com cimento de α -TCP e grânulos
de β -TCP/HA confeccionados em calota craniana de ratos.
/ André Luiz Marinho Falcão Gondim. – Porto Alegre,
2009.
65 f.

Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia
Bucomaxilofacial) – Faculdade de Odontologia, PUCRS.
Orientação: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli

1. Odontologia. 2. Terapia a Laser de Baixa
Intensidade. 3. Osteogênese. 4. Tecido Ósseo.
5. Biomateriais. 6. Fosfatos. 7. Ratos – Experiências.
I. Pagnoncelli, Rogério Miranda. II. Título.

CDD 617.52

DEDICATÓRIA

A **Deus**, meu maior amigo, inseparável, a quem, infelizmente, recorro muito mais nos momentos difíceis do que nos alegres. Agradeço por tudo o que fizestes e fazes por mim, pelas oportunidades e pelas dificuldades, tornando a minha vida feliz.

Aos meus pais, **João Gondim e Fátima Marinho Falcão**, por dedicarem a integralidade de suas vidas, única e exclusivamente, ao bem estar de seus filhos. Por tudo o que representam de bom na minha vida. Tudo o que um dia eu possa fazer, nunca terá a grandeza do amor a mim dedicado. São o meu maior orgulho, os meus maiores ídolos, os meus dois maiores exemplos na vida.

A minha irmã, **Roberta** pela amizade, pela generosidade, pelo enorme coração. Minha amiga e IRMÃ para toda a vida. Ainda és uma pequena plantinha, mas em breve, todos poderão avistar a enorme copa da sua árvore. Espero um dia poder ajudar alguém da maneira como me ajudas.

A **Maria Clara Piloto**, minha noiva, companheira de vários momentos. Sua presença em momentos difíceis que passei, me fizeram escolher o melhor caminho. As vitórias que tive nesse período também são suas. Agradeço por fazer parte da minha vida e torná-la maravilhosa, amo você.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Às minhas avós, **Hilda Gondim e Maria Guedes (*in memoriam*)**, pelo exemplo de fé e educação na família, são as matrizes de amor que cercam a minha família, amo vocês.

Aos meus familiares, tios, tias, primos e primas pelo apoio nessa caminhada, por confiarem em mim e no meu trabalho.

Aos meus primos, **Léo, Tone, Wladimir e Walter**, a grandeza da nossa é amizade e prova de que o “Amor” existe, só escrevendo outra Tese para explicar o que somos um para o outro, **meus irmãos**.

Aos meus amigos **Giuliano Luchi e Henrique Telles**, companheiros de toda hora, seja alegre ou triste. Agradeço a vocês a família que formamos, posso dizer que são meus irmãos, pessoas que posso confiar minha vida pessoal e profissional. Peço a Deus que ilumine os seus caminhos em busca da vitória.

Ao orientador, Prof. Dr. **Rogério Miranda Pagnoncelli**, pela tranquilidade com que orienta. Sua humildade e discrição o faz uma grande pessoa. Agradeço os erros e acertos que tive perante o Sr. me fizeram amadurecer como pessoa e crescer como profissional.

Aos meus colegas de mestrado, **Angelo Freddo, Daniel Gaziri**, companheiros de 2 anos, com quem muito aprendi, pela grande amizade, pelo respeito mútuo e pela oportunidade de conviver com pessoas de muito valor. Que Deus ilumine vocês.

Ao **Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo**, embora redunde os agradecimentos de outros alunos, em relação à forma exemplar de conduzir a pós-graduação, à competência profissional, à maneira ímpar de aplicar a ciência na sua profissão e ao exemplo que representas aos alunos da pós-graduação, eu agradeço, de forma muito especial, a amizade, a atenção dispensada para ouvir problemas e

discutir soluções. Juntamente com os demais professores, faz dessa escola, não apenas escola de ciência, mas acima disso, uma escola de vida.

Ao **Prof. Dr. Alfredo Júlio Fernandes Neto**, pela forma exemplar com que conduz a docência, és exemplo de professor, és horizonte de muitos alunos e tens um caráter inestimável. Por onde passas não deixas apenas ensinamentos científicos, mas ensinamentos de vida.

Aos **Profesores Claiton Heitz, Daniela Silva, Rogério Belle, Marília Gerardt**, , pela seriedade, pela competência e pela dedicação com que conduzem o serviço de cirurgia da PUCRS, sendo para nós, alunos, exemplos profissionais.

Às professoras Dras. **Maria Martha Campos e Fernanda Bueno Morrone**, pela oportunidade de executar o trabalho experimental. Agradeço a disponibilidade de atender pedidos até em fins de semana para aplicações de laser. Muito obrigado pela compreensão, respeito e dedicação que tiveram no decorrer deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS**, representada pelo Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Joaquim Clotet**, ao qual expresso meu respeito.

À **Faculdade de Odontologia da PUCRS**, representada pelo seu excelentíssimo Diretor, **Prof. Marcos Túlio**, por capacitarem a realização do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial – CTBMF.

À **Universidade Federal de Uberlândia**, através do **Hospital de Clínicas de Uberlândia**, onde fiz minha especialização, pela estrutura capaz de proporcionar a formação profissional e ser Instituição de referência para várias áreas do conhecimento.

À **Universidade Potiguar**, através da **Faculdade de Odontologia**, pela minha formação como Cirurgião-Dentista.

Aos funcionários da **Faculdade de Odontologia da PUCRS**.

*Deus nos concede, a cada dia,
uma página de vida nova no livro do
tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre
por nossa conta.*

Francisco Cândido Xavier

SUMÁRIO

1 RESUMO.....	8
2 INTRODUÇÃO.....	9
3 ARTIGO: EFFECT OF LASER IRRADIATION ON THE BIOMODULATION OF OSTEOGENESIS AFTER SURGICALLY INDUCED CALVARIAL DEFECTS IN RATS	18
4 ARTIGO: LASER THERAPY EFFECT ON DEFECTS FILLED WITH CEMENT A- TCP AND B-TCP/HA GRANULES OSTEOGENESIS MADE IN SKULL: STUDY IN RATS	30
4 DISCUSSÃO	43
REFERENCIAS.....	46
ANEXOS	50

1 RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar, por meio da análise histomorfometria, a biomodulação do processo de osteogênese em defeitos confeccionados em calotas craninas de ratos, submetidos à radiação com *laser* infravermelho (GaAlAs). Foram utilizados 30 ratos machos da linhagem *Wistar*, com peso entre 250 a 300 gramas, distribuídos aleatoriamente em 2 grupos, grupo teste (GT) e grupo controle (GC). Nos dois grupos temos 3 tempos de observação, 7, 14 e 21 dias, de forma que foram formados 6 subgrupos. Foram confeccionados defeitos de 4mm de diâmetro nos ossos parietais e em cavidades separadas, enxertados os biomateriais, α -TCP e β -TCP/HA. Os grupos testes receberam a terapia *laser* de baixa potência (LLLT), no espectro infravermelho ($\lambda = 830$ nm, 2 J/cm², 90mW, 27 s), no defeito ósseo de 4mm confeccionado nos ossos parietais do animal. Nos grupos controles, todo o protocolo cirúrgico foi realizado, porém sem a aplicação do *laser*. O protocolo de radiação foi estabelecido com intervalos de 48 horas, iniciando-se imediatamente após a sutura do procedimento cirúrgico e seguindo-se até o sexto dia de pós-operatório. Os animais foram eutanasiados aos 7, 14 e 21 dias após o procedimento cirúrgico. As lâminas foram estudadas segundo análise histomorfométrica. Para a análise morfométrica determinaram-se as médias das áreas de trabeculado ósseo neoformado em relação a área total do defeito. Os resultados obtidos demonstraram que, segundo a análise morfométrica, há biomodulação óssea positiva evidenciada nos grupos testes, com resultado significativo para o grupo teste 21 dias β -TCP/HA, apresentando maior área de trabeculado ósseo quando comparado aos grupos controles. Os resultados permitiram sugerir que a terapia *laser* no protocolo estabelecido atua como biomoduladora óssea, estimulando a osteogênese em áreas enxertadas, podendo ser utilizada como coadjuvante no processo de reparo ósseo.

2 INTRODUÇÃO

As perdas ósseas constituem um dos maiores problemas dentro das especialidades médicas e odontológicas e, provavelmente, estão associadas à exposição do tecido ósseo a várias condições patológicas. O tecido ósseo possui uma enorme capacidade regenerativa e, em muitas situações, é capaz de restabelecer perfeitamente sua estrutura óssea arquitetônica e as propriedades mecânicas, através de um processo complexo que envolve atividade local e sistêmica do organismo. Participam deste processo, vários tipos de células, enzimas e fatores de regeneração tecidual. A extensão e a velocidade da reparação dependem da localização anatômica, do agente etiológico, das dimensões da lesão, além das características biológicas de cada indivíduo. No entanto, a capacidade reparativa óssea tem limites e também pode falhar, caso certas condições não forem atendidas. Os fatores que impedem ou previnem o reparo ósseo são, entre outros: falhas de vascularização, instabilidade mecânica, defeitos sobre-estendidos e tecidos competidores com alta atividade de proliferação. A perda de fragmentos ou a remoção cirúrgica de fragmentos necróticos proporcionam defeitos, em geral, muito extensos para serem preenchidos de forma espontânea e promoverem, desta forma, o reparo ósseo^{1,2,3}.

Os procedimentos cirúrgicos no osso levam à perda da estrutura calcificada, promovendo um afastamento das bordas dos tecidos traumatizados, osteotomizados e ostectomizados, induzindo a uma cicatrização por segunda intenção, considerada o reparo mais complexo para o organismo. As perdas ósseas promovidas por fraturas faciais com perda de substância ou processos patológicos dentro do complexo estomatognático, tais como osteomielites, lesões císticas, tumores odontogênicos e defeitos ósseos periodontais, além da necessidade contínua e crescente de promover a osseointegração de implantes e enxertos ósseos nos sítios receptores e doadores, têm levado vários pesquisadores a procurar novas tecnologias que visem auxiliar a reparação do tecido ósseo ou acelerar o processo de cicatrização óssea^{2,3}.

A perda de estrutura óssea em maior quantidade, levando o organismo a um processo de reparo mais complexo e por vezes incompleto, é denominada “defeito crítico”, sendo aqueles cujas dimensões não permitem cicatrização espontânea ao

longo da vida. Devido à grande área de inserções musculares, o suprimento sanguíneo da calvária de humanos é inferior que da calvária de animais⁴. Como resultado, defeitos pequenos na calvária de humanos adultos não reparam espontaneamente. Com relação a isso, deve-se considerar que a capacidade regenerativa da calvária de animais experimentais como ratos e coelhos, pode ser considerada melhor do que em humanos⁵. Mulliken e Glowacki⁶ testaram e avaliaram diferentes implantes ósseos em defeitos experimentais de 4 mm em parietais de ratos, sendo que alguns dos implantes testados não apresentaram reparo completo dos defeitos ósseos em um período de 6 meses. Defeitos de 2 mm de diâmetro confeccionados em calvária de ratos Wistar falharam na cicatrização em um período de 12 semanas⁷. Tagaki e Urist⁸ determinaram que defeitos de 8 mm criados em calvárias de ratos Sprague-Dawley reduziram para 5 mm em 4 semanas e não obtiveram mais cicatrização ao longo de 12 semanas. Cada espécie animal e cada localização anatômica apresentam um padrão de reparo distinto, havendo, portanto, diferença no tamanho do defeito ósseo considerado crítico em cada caso⁴.

Na literatura mundial, existe unanimidade em designar o enxerto autógeno como o melhor e mais bem aceito material para tratamento dos defeitos ósseos. Contudo, a necessidade de uma cirurgia adicional em área doadora, diferente da área receptora, torna-se um inconveniente para muitos pacientes que não aceitam a intervenção em outras regiões do corpo. Em muitos casos também, a quantidade de enxerto disponível não é suficiente para o preenchimento da área receptora. Com o intuito de recuperar e/ou manter volume e qualidade óssea em regiões que perderam suas conformações anatômicas, o reparo das feridas ósseas é um tema altamente estudado, sendo que diversas pesquisas têm procurado desenvolver ou aperfeiçoar novos e promissores materiais biocompatíveis⁹.

O processo de osteoindução pode ser exemplificado pelo uso de células-tronco mesenquimais na formação óssea. Zago e Covas¹⁰ expressaram que a medula óssea contém, além das células-tronco hematopoiéticas e endoteliais, uma população rara de células-tronco multipotenciais capaz de suportar a hematopoiese e se diferenciar em diversas linhagens celulares, como os adipócitos, os condrócitos e os osteócitos. Mais recentemente, essas células têm sido denominadas de células-tronco mesenquimais, cuja diferenciação osteogênica requer a presença de indutores para adquirirem a morfologia de osteoblastos e passarem a expressar fosfatase alcalina e depositar matriz extracelular rica em cálcio. Segundo Den Boer

et al¹¹, compósitos biossintéticos são semelhantes a enxertos autógenos. Vários tipos de compostos de hidroxiapatita, reabsorvíveis ou não, têm sido testados como carreadores para a osseocondução, apresentando resultados satisfatórios. Características como biocompatibilidade, atoxicidade e resistência à deformação devem estar presentes nos substitutos ósseos para implantação no organismo. Resistência ou não à reabsorção é um requisito que varia conforme a aplicação desejada e, caso sejam reabsorvíveis, os biomateriais devem ser metabolizados pelo organismo ou excretados através de uma via normal fisiológica^{12,13,14}. São diversos os materiais utilizados para implantação no organismo, podendo ser divididos em quatro grupos: autólogos, homólogos, heterólogos e aloplásticos¹⁵. Os autólogos são realizados entre indivíduos da mesma espécie, o que lhe confere, mesmo que raro, o risco de transmissão de doenças, principalmente aquelas transportadas via príons, por exemplo, a doença de Creutzfeldt-Jacobs. O grupo dos homólogos, também conhecidos como alógenos, alogênicos ou aloenxertos, tem como exemplo, enxerto alógeno de osso liofilizado, que apresenta potencial de osteoindução, pela presença de proteínas morfogenéticas ósseas e; enxerto alógeno de osso liofilizado desmineralizado, com potencial osteocondutivo¹⁵. Os heterólogos são enxertos realizados entre diferentes espécies, havendo duas formas mais comumente usadas, que são o osso bovino liofilizado e o coral natural. Ambos materiais passariam por diferentes processos técnicos para se tornarem biocompatíveis e com estrutura similar à do tecido ósseo. São também conhecidos como heterólogos, heterógenos, xenógenos ou xenoenxertos e não apresentam risco de transmissão de doenças¹⁵. Os aloplásticos, também conhecidos como enxertos sintéticos, são divididos na classe dos polímeros e das biocerâmicas. Essas últimas são formadas por cálcio e fósforo em proporções similares a do osso. Os materiais biocerâmicos são o tricálcio fosfato, a hidroxiapatita e o vidro bioativo¹⁵. Os biomateriais podem ser definidos como substâncias de origem natural ou sintética que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. Eles são utilizados como um todo ou parte de um sistema que trata, restaura ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo ou, ainda, como um material não biológico utilizado em um dispositivo médico, com intenção de interagir com sistemas biológicos. O preenchimento de defeitos ósseos por enxertos aloplásticos é facilitado pela osteocondução, uma vez que o cimento fornece um suporte que guiará a formação

óssea. Para isso, algumas condições devem ser cumpridas: esse suporte deve ser constituído por um material bioinerte ou bioativo; sua forma e dimensões devem favorecer o crescimento ósseo pelo seu interior e; a deposição óssea deve ocorrer por substituição¹⁶. O fosfato tricálcico e a hidroxiapatita são biocerâmicas que têm larga aplicação na área biomédica. Nos últimos anos, têm sido aplicados em cirurgias ósseas, apresentando uma série de vantagens de utilização em ortopedia e traumatologia, sendo as mais destacadas a sua biocompatibilidade e bioatividade, que permitem a osteocondução dos tecidos e a presa “in situ”, permitindo maior facilidade de manipulação. Estes cimentos formam uma pasta plástica sob uma mistura com água e endurecem com o tempo. Sua plasticidade os torna facilmente adaptáveis à forma do defeito ósseo e seu subsequente endurecimento *in situ* assegura a aplicação de carga funcional na região¹⁷. A principal desvantagem dos cimentos de fosfato de cálcio é sua baixa resistência mecânica, que, no melhor dos casos, consegue igualar-se à do osso trabecular¹⁸. Os cimentos α e β -TCP (fosfato tricálcico), têm sido usados isolada ou associadamente entre si, ou combinados com hidroxiapatita. A hidroxiapatita (HA) é um fosfato de cálcio hidratado, componente majoritário da fase mineral dos ossos e dentes humanos; sua fórmula química é representada por: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ¹⁸. Os cimentos α e β TCP apresentam a seguinte fórmula respectivamente: $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, sendo quimicamente iguais e diferindo pela estrutura física de seus grânulos, os quais levam os cimentos a apresentarem características de biodegradabilidade diferentes. O índice de solubilidade e biodegradação do α -TCP é maior do que o do β -TCP¹⁹. Clinicamente, isso representa uma permanência do segundo cimento por mais tempo no organismo. A adição de hidroxiapatita visa aumentar os níveis de solubilidade e biodegradação do cimento β -TCP^{20,21}.

A palavra *laser* é um acrônimo para Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)^{22, 23}. Constitui uma forma de radiação não-ionizante, altamente concentrada, que, em contato com os diferentes tecidos, resulta em efeitos fototérmicos, fotoquímicos e não lineares. É considerada por muitos autores como a mais significativa descoberta do século passado, por envolver infinitas perspectivas nas áreas de pesquisas biológicas e ciências médicas²⁴. Essa terapia tem ação biomoduladora terapêutica importante no processo de reparo tecidual e é empregada amplamente nas diversas áreas da saúde, sendo a Odontologia uma das ciências que mais faz uso dessa

tecnologia. O *laser* de baixa potência é utilizado em tratamentos médicos e odontológicos visando a sua ação terapêutica sobre os diferentes tecidos biológicos. Estudos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, com severos e bem controlados parâmetros metodológicos, sugerem que a terapia *laser* de baixa potência (LLLT – *Low Level Laser Therapy*) modula vários processos biológicos em modelos animais após exposição a algum tipo de trauma. A LLLT atua na estimulação da reparação tecidual, melhorando a regeneração e a cicatrização de tecidos através da promoção da proliferação celular^{25,26}; da aceleração na formação de tecidos de granulação²⁷; do estímulo na síntese do colágeno, com formação das fibras pro-colágenas tipo I e tipo III¹ e do aumento da síntese de ATP (adenosina tri-fosfato)²⁵. A LLLT de baixa intensidade está bem indicada como coadjuvante no processo de reparo tecidual através de seus efeitos terapêuticos gerais²⁴. Proporciona ao paciente submetido a uma intervenção cirúrgica uma maior rapidez na cicatrização tecidual, reparando os tecidos moles, ósseo e nervoso; reduzindo o edema e o desconforto no pós-operatório²⁸, além de interferir na modulação e na atenuação da sintomatologia dolorosa²⁹.

Barushka et al³⁰ investigaram o efeito do *laser* de Hélio Neônio (He-Ne) no reparo ósseo de defeitos criados na tíbia de rato, empregando métodos bioquímicos e histomorfométricos quantitativos. A atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi máxima em 6 dias após a criação do defeito, sendo reduzida no 12º dia. A cinética total da atividade da fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP) coincidiu com aquela da ALP, mas com pico aos 12 dias após a cirurgia. O cálcio acumulou progressivamente no local da lesão, com pico aos 11 dias e subsequente declínio. A avaliação histológica revelou afinamento do canal intramedular com osso jovem no local da lesão 6 dias após a cirurgia e progressiva diminuição do defeito ósseo cortical por ossificação membranosa. A irradiação direta no defeito ósseo com *laser* He-Ne no 5º e 6º dia após a cirurgia alterou a população de células osteoblásticas e osteoclásticas, como demonstrado pelo aumento significativo de 2,2 pontos na atividade da ALP em relação aos ratos controle (não irradiados com 10 dias após a cirurgia) e uma diminuição significativa de 40% na atividade da TRAP em 11 dias. A análise histomorfométrica revelou um acúmulo mais rápido de novo osso reparativo no local do defeito, nos ratos irradiados com *laser*. O volume fracionado (percentual total do volume da zona do defeito) do novo osso compacto reparativo foi de $27 \pm 9\%$, $88 \pm 9\%$, e $94 \pm 6\%$ em 10, 13 e 15 dias após o defeito, respectivamente, nos

ratos tratados com *laser*. Os valores respectivos do controle foram $9 \pm 7\%$, $44 \pm 9\%$, e $58 \pm 5\%$ para o mesmo intervalo de tempo. A fração de volume do trabeculado ósseo no defeito diminuiu mais rapidamente com o tempo nas tíbias tratadas com *laser* do que no controle. Foi sugerido que a irradiação *laser* He-Ne com tempo, energia e frequência adequados após o defeito, provavelmente, afeta a população local de osteoblastos e osteoclastos, como demonstrado pela alteração na atividade do ALP e TRAP. Ademais, a análise histomorfométrica revelou um reparo ósseo mais acentuado em dois pontos distintos da tíbia em relação às demais regiões naqueles animais submetidos à laserterapia, Barushka et al³⁰.

Saito e Shimizu³¹ avaliaram os efeitos da irradiação com *laser* de baixa potência na regeneração óssea durante expansão de sutura palatina média em ratos. A irradiação com *laser* diodo Galium-alumínio-arsênio 100 mW foi aplicada na sutura palatina média durante expansão, por 7 dias (3 a 10 minutos por dia), 3 dias (7 minutos por dia por dia 0-2 ou 4-6) e 1 dia (21 minutos ininterruptos no dia 0). A regeneração óssea na sutura média palatina foi estimada pelo método histomorfométrico. Após 7 dias, o grupo irradiado mostrou aceleração significativa de 1,2 a 1,4 pontos, em comparação aos ratos não irradiados. A irradiação durante os períodos iniciais da expansão (dias 0 a 2) foi mais efetiva; entretanto, em nenhum dos períodos tardios (4 a 6 dias) a irradiação teve efeito na regeneração óssea. Esses resultados sugerem que a irradiação *laser* de baixa potência pode acelerar a regeneração óssea na sutura palatina mediana durante a expansão rápida do palato e que esse efeito é dependente não somente na dose de irradiação *laser* total, mas também do tempo e da frequência da irradiação. Esses dados sugerem que a terapia *laser* pode ter benefício terapêutico na inibição de recidiva e redução do período de retenção pela aceleração da regeneração óssea na sutura palatina mediana. Ozawa et al³² investigaram os efeitos da irradiação *laser* de baixa energia em vários estágios da proliferação celular, formação de nódulos ósseos, atividade da fosfatase alcalina e expressão gênica da osteocalcina, usando células em cultura obtidas da calvária de ratos. Os osteoblastos foram isolados da calvária de fetos de ratos e irradiados com um *laser* Ga-Al-As de baixa energia (830 nm, 500 mW, 1 min, $3,82 \text{ J/cm}^2$) em vários estágios da cultura de células (1-16 dias). A irradiação nos estágios iniciais estimulou significativamente a proliferação celular, atividade de fosfatase alcalina e expressão da osteocalcina. Além disso, estimulou significativamente o maior número e maior área de nódulos ósseos que se

desenvolveram na cultura no 21º dia. Entretanto, esses efeitos não puderam ser encontrados nas irradiações dos períodos tardios. Esses resultados sugerem que a irradiação *laser* pode ter papéis importantes na estimulação da formação óssea. O estímulo para a proliferação de células, especialmente a proliferação de células formadoras de nódulos de linhagens osteoblásticas e estimular a diferenciação celular, resultando em um aumento no número de células osteoblásticas mais diferenciadas e um aumento na formação óssea. A estimulação e a formação óssea podem ser vistas somente quando células imaturas são irradiadas.

Freitas, Baranauskas e Cruz-Höfling³³ estudaram a influência de um *laser* He-Ne na osteogênese após um defeito cirúrgico crítico. Foram utilizados ratos machos Wistar com peso entre 250 e 300 g. O defeito ósseo realizado na tíbia de ratos foi de 2 mm de diâmetro e atingiu apenas uma cortical óssea. O tratamento com *laser* foi iniciado 24 horas após a cirurgia. Os animais foram separados em três grupos, pelas diferentes doses de irradiação e, após as aplicações diárias, eles foram submetidos à eutanásia com 8 e 15 dias após a cirurgia. A análise microscópica óptica e eletrônica revelou que o tratamento com *laser* das lesões ósseas com doses de 31,5 e 94,7 J/cm² resulta em formação de fino trabeculado ósseo, que indica maior síntese de fibras colágenas e que a atividade osteoblástica foi aumentada pela radiação *laser* de baixa energia. Silva e Camilli²⁶ avaliaram os efeitos da irradiação *laser* de baixa potência no reparo ósseo de crânios de ratos tratados com enxerto autógeno. Um defeito medindo 3 mm de diâmetro foi produzido no osso parietal esquerdo e preenchido com osso parietal do lado direito. Os animais foram divididos em 03 grupos de 20 ratos cada: controle não-irradiado, irradiado com 5,1 J/cm² e irradiado com 10,2 J/cm². O *laser* (2,4 mW, 735 nm, 3,4 x 10⁻² W/cm², 3mm área) foi aplicado 3 vezes por semana por 4 semanas. Um maior volume de osso neoformado foi observado no grupo irradiado com 10,2 J/cm². Em ambos os grupos irradiados, o maior volume de osso neoformado ocorreu somente nas primeira 2 semanas. Os resultados demonstram que a irradiação *laser* no local enxertado estimula a osteogênese durante os estágios iniciais do processo de cura nos defeitos do crânio de ratos e que esse efeito é dose-dependente. Weber et al³⁴ avaliaram histologicamente a influência do *laser* diodo infravermelho (GaAlAs, λ=830 nm, 50mW) no processo de cicatrização óssea de feridas cirúrgicas em fêmur de ratos Wistar, submetidas a enxerto ósseo autógeno. Os grupos experimentais tratados com *laser* receberam radiação a cada 48 horas, sendo a primeira realizada

durante o procedimento cirúrgico. A dosimetria utilizada foi de $10\text{J}/\text{cm}^2$ por sessão, divididas em quatro pontos de $2,5\text{J}/\text{cm}^2$. Os autores concluíram que a terapia a *laser* resultou num efeito biomodulador positivo sobre o processo de cicatrização óssea em cavidades de fêmur de ratos Wistar submetidas a enxertos ósseos autógenos, sendo o efeito maior quando o *laser* é aplicado diretamente na loja cirúrgica, durante o trans-operatório, antes da adaptação do enxerto ósseo.

O mecanismo pelo qual a radiação *laser* interfere na formação óssea não é completamente entendido. É provável que a regeneração óssea seja dependente não apenas da dose de energia total da radiação *laser*, mas também do tempo e da forma de radiação^{31,1}. Estudos recentes têm sugerido que parâmetros de densidade de energia e intensidade da radiação *laser* são fatores biológicos independentes entre si e contribuem diretamente para o sucesso ou fracasso da laserterapia de baixa potência¹.

Objetivando analisar histologicamente o efeito da laserterapia com comprimento de onda de 830nm no reparo de defeitos ósseos padronizados em fêmur de ratos albinos Wistar e enxertados com osso bovino inorgânico (Gen-Ox) e associados ou não à membrana cortical óssea descalcificada (Gen-derm), Pinheiro et al³⁵ utilizaram cinco grupos randomizados para o estudo: Grupo I (controle); Grupo IIA (Gen-Ox); Grupo IIB (Gen-Ox associado ao laser); Grupo IIIA (Gen-Ox associado à Gen-derm) e Grupo IIIB (Gen-Ox associado à Gen-derm e *laser*). Os animais dos grupos submetidos à radiação foram radiados a cada 48 horas, num período total de 15 dias. A primeira radiação foi instituída imediatamente ao transoperatório, sendo aplicada transcutaneamente em quatro pontos ao redor do defeito ósseo criado, tendo cada ponto recebido uma dose total de $4\text{ J}/\text{cm}^2$, Ø 0.6mm, 40 mW. Os animais foram eutanasiados em 15, 21 e 30 dias de pós-operatório e submetidos à análise histológica, a qual demonstrou um reparo ósseo mais avançado nos grupos irradiados quando comparados ao controle, com uma maior formação óssea e uma quantidade de fibras colágenas ao redor do enxerto ósseo bovino inorgânico dentro do defeito criado, a partir dos 15 dias de pós-operatório, considerando a capacidade osteocondutora do enxerto e o incremento na cortical óssea quando associada à membrana Gen-derm. Assim, os autores concluíram que a laserterapia, no protocolo instituído, modulou um efeito positivo no reparo de defeitos ósseos enxertados associados ou não ao uso de membranas biológicas.

Pinheiro et al³⁵ e Khadra et al³⁶ recomendam, através da observação de experimentos clínicos, que a laserterapia de baixa intensidade visando a obtenção de efeitos terapêuticos e biomoduladores em tecidos moles e ósseos deverá ser estabelecida com densidades de energia variando entre 1,8 e 5,4 J/cm² e com densidades de potência variando entre 5 e 90 mW.

Com a finalidade de contribuir para o estudo do efeito biomodulador do laser em processos de reparo ósseo e da utilização de substitutos ósseos, o presente estudo se propõe a avaliar microscopicamente a influência da laserterapia em defeitos preenchidos com o α -TCP e o β -TCP/HA, quando comparados ao grupo controle.

3 ARTIGO: EFFECT OF LASER IRRADIATION ON THE BIOMODULATION OF OSTEOGENESIS AFTER SURGICALLY INDUCED CALVARIAL DEFECTS IN RATS

Effect of laser irradiation on the biomodulation of osteogenesis after surgically induced calvarial defects in rats

André L. M. F. Gondim, BDS, MSc ¹; Giuliano H. M. Luchi, BDS, MSc ¹; Gisela Grandi, BDS, MSc ¹; Daniela N. Silva, BDS, MSc, PhD ²; Carlos E.C.P. de Souza ³; Rogério M. Pagnoncelli, BDS, MSc, PhD ²

¹ Post-Graduate Program in Dentistry, PhD Student in Oral and Maxillofacial Surgery; Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul-PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

² Senior Lecturer in Oral and Maxillofacial Surgery, Post-Graduate Program in Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul-PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

³ Undergraduate Student in Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul-PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

Correspondence to:

André Luiz Marinho Falcão Gondim
Av. Protásio Alves, 7355, AP 403, bl 3
91310-001 - Porto Alegre – RS – Brazil
Phone: +55 51 8187 5090
E-mail: algondim@yahoo.com.br

Effect of laser irradiation on the biomodulation of osteogenesis after surgically induced calvarial defects in rats

Abstract: *Background and Objective:* The potential use of laser irradiation, due to its photochemical and photobiological properties, for the biomodulation of bone repair has been investigated all by many authors as a method that stimulates osteogenesis and shortens the time required for bone regeneration. This study aims to assess the biomodulation of osteogenesis by the application of infrared laser irradiation to rat calvaria after the surgical induction of critical defects. *Materials and Methods:* An experimental study was carried out to assess the biological reactions of irradiated tissues and the intensity of new bone formation. The animals were randomly assigned to four groups: two control groups (CG-I-II – not treated with laser) and two treatment groups (TG-I-II - irradiated with infrared laser), at 2 J/cm² and 90 mW. The animals were euthanized at 7 and 21 days and the histological sections stained with H&E were analyzed at the same observation times. *Results:* The descriptive results show that laser irradiation had a positive biomodulatory effect on the osteogenic process in treated animals, since they had higher new bone formation at 7 and 21 days. *Conclusions:* The statistical analysis revealed a higher rate of new bone formation in both groups at 21 days, with larger areas of new bone growth. The higher rates of new bone formation in the laser-treated groups suggest that low level laser irradiation can be used as an adjuvant in the osteogenic process for bone tissue repair.

Keywords: Bone development. Laser therapy. Low-level. Osteogenesis.

Introduction

Low level laser irradiation (LLLI) is used in medical and dental treatments for the repair of different biological tissues. *In vitro* and *in vivo* experimental studies, using strict and well-controlled methodological criteria, suggest that LLLI modulates several biological processes in animal models after some kind of trauma. Low power lasers stimulates tissue repair, improving regeneration and healing of tissues by promoting cell proliferation and accelerating the formation of granulation tissues^{6,15}.

The photobiostimulatory effect of laser therapy has been corroborated in the literature. In laboratory studies, low power lasers have a pronounced effect on the

proliferation, differentiation and calcification of osteoblasts; however, there exists a therapeutic window that is specific to this effect. Cell proliferation and DNA synthesis are increased by laser irradiation only when cells are in active growth. In addition, laser irradiation increases accumulation of calcium and speeds up *in vitro* calcification. In *in vivo* studies, laser irradiation increases bone deposition and accelerates bone regeneration in the initial stages of bone repair^{1,16}.

The present study aimed to histomorphometrically evaluate the biomodulatory effect of I on osteogenesis after surgically induced calvarial defects in rats.

Materials and Methods

The sample consisted of 40 male Wistar rats weighing between 300 and 500 grams, randomly distributed into four different groups: two control groups (CG-I-II) and two treatment groups (TG-I-II). CG-I and TG-I were observed during 7 days whereas CG-II and TG-II were observed during 21 days.

Prior to the surgical procedure, the animals were weighed and received general anesthesia which promoted sufficient time for manipulation; thereafter, the calvarial region was shaved and disinfected with povidone iodine (PVPI). A continuous cross-sectional incision measuring 1.5 cm in length was made on the calvarium. The subcutaneous and muscular tissues were divulsed, thus allowing access to the exposed surface of the calvarium. Afterwards, a cylindrical 4-mm hole was drilled in the right parietal bone region 2 mm from the midpoint of the sagittal suture, under constant irrigation. The rupture of the inner calvarial cortex was used as depth parameter. The muscular tissue and skin were repositioned and sutured with a 4-0 Mononylon[®] thread.

The first out of four laser irradiation sessions was performed immediately after skin suture and every 48 hours thereafter, at 0, 2, 4 and 6 days, in TG-I and TG-II, according to the laser irradiation research protocol of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil.

A gallium-aluminum-arsenide (GaAlAs) laser (Thera Laser[®]) was used as active medium at a wavelength of 830 nm (TG-I). LLLI complied with the following protocol:

- TG-I: infrared laser (830 nm): 2 J/cm² at 4 mm from the midpoint of the sagittal suture, approximately at the center of the defect, power of 90mW, continuous mode, and length of 27 seconds. The total energy applied up to the end of the procedure amounted to 8 J/cm²;

- TG-II: infrared laser (830 nm): 2 J/cm² at 4 mm from the midpoint of the sagittal, approximately at the center of the defect, power of 90mW, continuous mode, and length of 27 seconds. The total energy applied up to the end of the procedure amounted to 8 J/cm²;
- CG-I and CG-II: no laser irradiation.

The animals from CG-I and TG-I were euthanized on the 7th postoperative day whereas those from CG-II and TG-II were killed on the 2st postoperative day by continuous isoflurane inhalation in a saturated chamber, in compliance with the Universal Declaration of Animal Rights. The histological samples were processed, were assigned a registry number and evaluated blind.

The microscopic analysis was made by descriptive analysis of H&E-stained slides. The slides were analyzed under a light microscope to determine the bone repair process. A 40x magnification was used. The histological aspects of the bone specimens submitted to diode laser radiation and the bone specimens obtained from the control group were described by taking into account the formation of new bone tissue. All slides were coded so as to prevent the identification of the groups.

The microscopic analysis proved to be an important tool for the quantitative measurement of the newly formed bone trabeculae. For this reason, the slides obtained from each animal were submitted to microscopic examination with the use of a computational system (Image-Pro Plus) for image capture and analysis. Using a fixed-focus lens and a clear field, the microscope image was captured by a videocamera connected to a computer, using a 40x magnification, and converted into an analog electrical signal and transmitted to the computer screen, where the image was digitized using a set of pixels (1 pixel = 6.5 μ m).

After saving the images, which comprised 36 histological sections corresponding to all analyzed groups (control and treatment), in JPEG format, the Image Tool Scripting Language was used for histomorphometric analysis. This program allowed assessing the process of bone repair by tracing the contour of the desired regions with the help of the mouse cursor and measuring the areas of new bone formation in the endosteal region and in the marrow.

The values obtained from each newly formed bone trabecula were inserted in a table, which shows total bone formation data for each slide. All these values were exported into an Excel spreadsheet, inserted in the definitive tables and submitted to statistical analysis using SPSS for Windows.

The histomorphometric analysis was conducted without previous knowledge of the distribution of images into the respective study groups; therefore, all slides were coded and all images were captured.

The quality of bone repair was analyzed comparatively across the study groups, and the aspects of tissues were described. The following was observed: new bone formation at the borders of the defect (40x magnification); new bone formation at the center of the defect (40x magnification).

After image acquisition, the contour of the desired regions (newly formed bone) was traced with the help of the mouse cursor, and the value of these areas was quantified, in μm^2 , by Image-Pro Plus 4.5.1. The initial area of each defect was also quantified so that we could obtain the proportion of newly formed bone (proportion of newly formed bone = area of newly formed bone/total area of the defect).

Results

Table 1 compares observations at 7 and 21 days. At 7 days, the numerical average was higher in the treatment group (0.52) than in the control group (0.16). The same occurred for the groups assessed at 21 days, with an average new bone formation of 6.33 in the treatment group compared to 4.52 in the control group. Table 2 indicates that, although the average of bone formation was higher in both treatment groups when compared with control group, the Student t test did not show any statistically significant difference across groups, both at 7 and 21 days, with $p=0.093$ and $p=0.158$, respectively. Graphic 1 shows the mean values obtained at 7 and 21 days.

Table 3 shows that when compared 7 and 21 days, both in the same group, there is a statistically significant difference, with higher averages such in treatment group (6,33) as in control group (4,52)

Discussion

The advent of laser therapy has brought several benefits in treatment of patients. Nevertheless, as this is a recent technological advance, standards regarding its application to bone tissues require comprehensive research so that parameters can

be properly established and so that the efficiency of its biomodulatory effect can be improved. Therefore, it is necessary to define appropriate protocols, with correct power and energy densities, wavelength, irradiation sessions, length and type of exposure to the laser equipment, as well as the interaction of laser with each type of irradiated tissue^{5,9}.

The huge difference in laser therapy parameters in healing processes and the wide variety of models used have hindered the adequate interpretation of its effects. This is so because the selection of parameters for definition of laser irradiation protocols is made according to authors' experience, since no universally accepted parameters exist. Also, several researchers who use similar laser protocols and units have reported inconsistent results. There does not appear to be a single parameter that produces biomodulatory effects, but rather a combination of different parameters and their variations, depending on the experimental model used¹².

In this study, we used infrared GaAlAs diode laser ($\lambda=830$ nm) due to its higher penetration capacity, especially into subcutaneous tissues. It is common knowledge that penetration into and (red and infrared) light irradiation on the skin are closely related to the wavelength of the emitting source and to the individual optical properties of skin layers. With regard to tissue properties, infrared laser is poorly absorbed by water or by skin chromophores, thus warranting a deeper penetration into tissue strata^{9,4}.

The importance of choosing an adequate level of energy has been underscored by many authors, but the recommended energy for optimal biomodulation varies considerably. Experimental data reveal that low doses ($10-103$ J/cm²) applied within short time periods (10-100 s) have positive biomodulatory effects, which persist for a long time interval⁶.

In the present study, an effective dose of 2 J/cm² per session was used, following the clinical protocol established by the Dental Laser Research, PUCRS, Brazil. Based on clinical experiments, Khadra et al.⁸ recommend that LLLI with the aim of therapeutic and biomodulatory effects on soft and bone tissues should be established with energy densities between 1.8 and 5.4 J/cm² and with power between 5 and 90 mW. Kreisler et al.¹⁰ also observed that doses ranging from 2 to 8 J/cm² can produce positive biomodulatory effects on irradiated cells.

Irradiation every 48 hours after the surgically induced defect was used in order to allow the inflammatory process to abate and the repair of surgical wounds to begin, as laser seems to be more efficient thereafter, by increasing cell mitoses and setting

out conditions that permit speeding up bone repair, as previously described by Karu⁶ and Merli et al¹¹.

The histomorphometric analysis showed the numerical means for areas submitted to laser irradiation and a larger formation of bone trabeculae at 7 and 21 days, but the results were not statistically significant. This phenomenon suggests why the use of laser irradiation every 48 hours may be effective when applied during the cellular proliferative phase, thus confirming the studies carried out by Karu⁶, Pinheiro and Gerbi¹², and Weber et al¹⁷.

Angiogenesis is one of the factors accountable for bone repair. The production of growth factors and other angiogenic mediators influence osteoblast differentiation. Hypoxia caused by tissue injury regulates the production of angiogenic factors and their receptors seek to restore the blood supply to the surgical site. Blood vessels play an important role in the formation and maintenance of bone tissue. Lasers can stimulate and increase the levels of fibroblastic and osteoblastic growth factors found in the healing of bone tissue. These growth factors act directly on the proliferation, clustering and differentiation of cells, located on all bone surfaces, increasing the proliferation rates and stimulating the maturation and secretion of the bone matrix^{12,17}. The present study suggests that an accelerated bone repair may result from low level laser irradiation in the bone matrix synthesis by an increase in vascularization and modulation of cellular synthesis.

The results obtained by the descriptive and quantitative analysis show that new bone formation was higher, but without statistically significant association, in the treatment group, comparatively to the control group, being therefore consistent with the studies conducted by Saito and Shimizu¹³, Freitas et al², Kawasaki and Shimizu⁷, Gerbi et al³, Merli et al¹¹, da Silva e Camilli¹⁵, and Weber et al¹⁷.

Quantitatively speaking, the results obtained in this study show differences between the treatment and control groups, with larger formation of bone trabeculae in the groups submitted to low level laser irradiation. Although, no statistically significant association was observed, numerical means have shown the positive effect of low level laser irradiation on bone repair. These results are in agreement with the studies of Saito and Shimizu¹³, Kawasaki and Shimizu⁷, Silva Júnior¹⁴, Merli et al¹¹, and da Silva and Camilli¹⁵, who also observed an increase in new bone formation in laser-treated groups, by using an image analysis software and morphometric analysis.

By quantitatively analyzing the means of newly formed bone trabeculae at the different observation periods, it was possible to perceive that the animal model used

had higher levels of bone formation during the first 21 days, with homogeneous new bone formation rates compared to the assessment at 7 days, which differs from the findings of Gerbi et al³, Merli et al¹¹, and da Silva and Camilli¹⁵, who report that the first 14 postoperative days coincide with the initial decline in alkaline phosphatase activity, which is an important hallmark of the proliferation, differentiation and maturation of osteoblasts, showing a higher acid phosphatase level, which is important for osteoclastic activity, thus giving rise to bone resorption processes.

The literature, by way of the dynamic study of osteogenesis, reveals that the outer surface of compact bones is lined with a condensed and highly vascularized layer of fibrous tissue, known as periosteum, which contains several osteoprogenitor cells. During bone growth or repair, osteoprogenitor cells differentiate into osteoblasts, which are responsible for the deposition and maturation of concentric lamellae of the cortical bone through the appositional growth of the organic bone matrix. By assessing the areas of bone trabeculae and the observation periods, we found a higher but not statistically significant mean value for the formation of bone trabeculae in the treatment group, in proportional progression to the observation period. This fact can be explained by the dynamic process of bone remodeling. The increase in bone trabeculae observed at 21 days confirms the findings described in the literature, as pointed out by Gerbi et al³, Merli et al¹¹, and da Silva and Camilli¹⁵.

The potential use of lasers in the biomodulation of osteogenesis, due to their photochemical and photobiological properties, have been investigated by several authors; however, the literature shows that the mechanism that regulates bone repair under the influence of laser therapy still remains uncertain. Detailed and specific studies should be carried out to corroborate the results obtained in the present study, thus allowing for the enhanced efficiency of the positive biomodulatory effects described herein. The development of new technologies in this field may improve the results of laser irradiation on the biomodulation of bone tissue repair.

According to the methodology and irradiation parameters used, in addition to the descriptive, quantitative, and histomorphometric results obtained in this study, we may conclude that LLLI can be used as an adjuvant in the osteogenic process required for bone tissue repair.

References

- 1 - Dörtbudak O, Haas R, Mallath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res.* 2000; 11:540-5.
- 2 - Freitas IGF, Baranauskas V, Cruz-Höfling MA. Laser effects on osteogenesis. *Appl Surf Sci.* 2000; 154:548-54.
- 3 - Gerbi ME, Pinheiro AL, Marzola C, Limeira Júnior F de A, Ramalho LM, Ponzi EA, et al. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830 nm. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23:382-8.
- 4 - Gordjestani M, Dermaut L, Thierens H. Infrared laser and bone metabolism: a pilot study. *Int J Oral and Maxillofac Surg.* 1994; 23:54-6.
- 5 - Hallman HO, Basford JR, O'Brien JF, Cummins LA. Does low-energy helium-neon laser irradiation alter "in vitro" replication of human fibroblasts? *Lasers Surg Med.* 1988; 8:125-9.
- 6 - Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.* 1989; 56:691-704.
- 7 - Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Laser Surg Med.* 2000; 26:282-91.
- 8 - Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Effect of laser irradiation on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials.* 2005; 26:3503-9.
- 9 - Kolárová H, Ditrichová D, Wagner J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. *Lasers Surg Med.* 1999; 24:231-5.
- 10 - Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, d'Hoedt B. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002; 30:365-9.
- 11 - Merli LA, Santos MT, Genovese WJ, Faloppa F. Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23:212-5.
- 12 - Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24:169-78.
- 13 - Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am J of Orthod Dentofacial Orthop.* 1997; 111:525-32.
- 14 - Silva Júnior AN, Pinheiro AL, Oliveira MG, Weismann R, Ramalho LM, 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.* 2002; 20:83-7.
- 15 - Silva RV da, Camilli JA. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. *J Craniofac Surg* 2006; 17:297-301.

16 - Ueda Y, Shimizu N. Effects of pulse frequency of low-level laser therapy (LLLT) on bone nodule formation in rat calvarial cells. J Clin Laser Med Surg. 2003; 21:271-7.

17 - Weber JB, Pinheiro AL, de Oliveira MG, Oliveira FA, Ramalho LM. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. Photomed Laser Surg. 2006; 24:38-44.

Legends

Table 1 - Descriptive results (mean, standard deviation, median) for the values of the result in percentage of all groups, according to the periods of observation, considering a confidence interval (CI) of 95%.

Table 2 – Results of comparison between test and control group for each time

Table 3 – Results of comparison between the times 07 and 21 days for each group

Gráfico 1 – Results of comparison between test and control group for each time

Table 1. Descriptive results (mean, standard deviation, median) for the values of the result in percentage of all groups, according to the periods of observation, considering a confidence interval (CI) of 95%.

<i>group</i>	<i>time</i>	<i>Number of cases</i>	<i>Mean</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Median*</i>	<i>CI 95%**</i>
Control Group	7 days	10	0,16	0,33	0,00	[-0,08 a 0,39]
	21 days	10	4,52	2,21	5,02	[2,94 a 6,09]
Test Group	7 days	8	0,52	0,53	0,39	[0,08 a 0,96]
	21 days	8	6,33	3,00	7,07	[3,82 a 8,84]

* Value that divides in the middle the distribution of data or central value of distribution

** Confidence interval with 95% probability of containing the average parameter

Table 2. Results of comparison between test and control group for each time

<i>Group</i>	<i>Number of cases</i>	<i>Mean</i>	<i>Standard derivation</i>	<i>Median</i>	<i>CI95%</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
Control Group	20	2,34	2,71	1,13	[1,07 a 3,61]	-1,026	0,312
Grupo Teste	16	3,43	3,65	1,50	[1,48 a 5,37]		

Source: Data from the research (PUCRS, 2007).

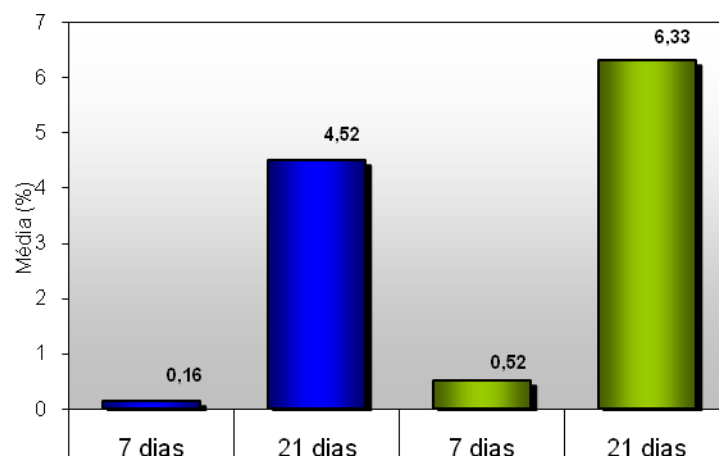
Table 3. Results of comparison between the times 07 and 21 days for each group

<i>Group</i>	<i>Number of cases</i>	<i>Mean</i>	<i>Standard derivation</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
Time 7 days					
Control Group	10	0,16	0,33	-1,787	0,093
Test Group	8	0,52	0,53		
Time 21 days					
Control Group	10	4,52	2,21	-1,480	0,158
Test Group	8	6,33	3,00		

Source: Data from the research (PUCRS, 2007).

* Shows statistically significant difference between the times 07 and 21 days for $p \leq 0.05$...

Graph 1. Results of comparison between test and control group for each time



Source: Data from the research (PUCRS, 2007).

4 ARTIGO: LASER THERAPY EFFECT ON DEFECTS FILLED WITH CEMENT A-TCP AND B-TCP/HA GRANULES OSTEOGENESIS MADE IN SKULL: STUDY IN RATS

Laser therapy effect on defects filled with cement α -TCP and β -TCP/HA granules osteogenesis made in skull: study in rats

André L. M. F. Gondim, BDS, MSc¹; Carlos E.C.P. de Souza³; Giuliano H. M. Luchi, BDS, MSc¹; Henrique T. R. Oliveira, BDS, MSc¹; Rogério M. Pagnocelli, BDS, MSc, PhD²

¹ Post-Graduate Program in Dentistry, PhD Student in Oral and Maxillofacial Surgery; Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul-PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

² Senior Lecturer in Oral and Maxillofacial Surgery, Post-Graduate Program in Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul-PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

³ Undergraduate Student in Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul-PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

Correspondence to:

André Luiz Marinho Falcão Gondim
Av. Protásio Alves, 7355, AP 403, bl 3
91310-001 - Porto Alegre – RS – Brazil
Phone: +55 51 8187 5090
E-mail: algondim@yahoo.com.br

Laser therapy effect on defects filled with cement α -TCP and β -TCP/HA granules osteogenesis made in skull: study in rats

Abstract: This present paper has as aim to evaluate, by histomorphometric analysis, the biomodulation of osteogenesis process in defects made in rats' skull, submitted to infrared laser radiation (GaAlAs). Thirty Wistar male rats were used, whose weight varied between 250gr and 300gr, randomly distributed in 2 groups, Test Group (TG) and Control Group (CG). Both groups had 3 times of observation, 7, 14, and 21 days, forming 6 subgroups. Defects of 4mm of diameter were made in parietal bones and in separated cavities, and grafted with biomaterials, α -TCP and β -TCP/HA. Test Groups received Low Level Laser Therapy (LLLT), in infrared spectre ($\lambda = 830$ nm, 2 J/cm², 90mW, 27 s), in the 4mm bone defect made in the parietal bones of the animal. In the Control Groups were made all the surgical protocol, however with no laser application. Radiation protocol was established with 48 hours intervals, starting immediately after the procedure suture and being followed until the sixth day of postoperative. The animals were euthanized at 7th, 14th and 21st days after the surgical procedure. The slides were studied according to histomorphometric analizis. For the morphometric analysis were determined the average of the areas of neoformed bone trabeculae on the total area of the defect. The obtained results show that, according to the morphometric analysis, there is positive bone biomodulation evidenced in Test Groups, with a significant result in 21 days Test Group β -TCP/HA, presenting a greater area of bone trabeculae than the Control Groups. The results suggest that laser therapy in established protocol acts as bone biomodulator, stimulating the osteogenesis in grafted areas, which can be used as adjuvant in bone repair process.

Keywords: Healing, Repair, Bone Tissue, Bone substitutes, Biomaterials, Phosphate

Introduction

The bone loss is a major problem within the medical and dental specialties. The bone has an enormous regenerative capacity, and in many situations, is able to fully restore its architectural bone structure and the mechanical properties, through a complex process that involves local and systemic activity of the body. The extent and speed of the repair depends on the anatomical location of the causative agent, the size

of the lesion, in addition to the biological characteristics of each individual. However, the bone repair capacity has limits and can also fail if certain conditions are not met. The loss of fragments or the surgical removal of necrotic fragments provide defects, in general, very large to be filled in order to promote spontaneous and thus the bone repair^{15, 14, 18}.

In literature, there is unanimity in designating the autogenous graft as the best and most accepted material for treatment of bone defects. In order to recover and / or maintain bone volume and quality in areas that lost their anatomical conformations, the repair of injured bone is a highly studied subject, and that several studies have sought to develop or improve new and promising biocompatible materials¹¹.

The biomaterials can be defined as substances of natural or synthetic origin that are tolerated in a transient or permanent way by various tissues that constitute the bodies of living beings. They are used as a whole or part of a system that treat, restore or replace any tissue, organ or function of the body, or as a non-biological material used in a medical device intending to interact with biological systems. The filling of bone defects by alloplastic grafting is facilitated by osteoconduction, since the cement provides a guide to support bone formation. The tricalcium phosphate and hydroxyapatite are bioceramics which have large application in the biomedical area. Lately, have been used in bone surgery, showing a number of advantages for use in orthopedics and traumatology, the most prominent of it biocompatibility and bioactivity, which allow osteoconduction and hardening of tissues in situ, allowing ease of manipulation.

Experimental studies in vitro and in vivo, with severe and well-controlled methodological parameters, suggest that Low Level Laser Therapy (LLLT) modulates various biological processes in animal models after exposure to some type of trauma. The LLLT acts on the stimulation of tissue repair, improving regeneration and the healing of tissue by promoting cell proliferation^{6,20}; the acceleration in the formation of granulation tissue⁷; the stimulus in the synthesis of collagen, forming the fiber pro-collagen type I and type III¹⁵; and increased synthesis of ATP (adenosine triphosphate)⁶. The low intensity of LLLT is well indicated as adjuvant in tissue reparation process through its general therapeutic effects¹. Gives the patient underwent a surgical intervention more rapidly in tissue healing, repairing the soft tissue, bone and nerve, reducing the swelling and discomfort in the postoperative²¹, also interfering with modulation and the relief of painful symptoms⁴.

Aiming to histologically analyze the effect of the laser with a wavelength of 830nm in the repair of standardized bone defects in femur of Wistar albino rats and grafted with inorganic bovine bone (Gen-Ox) and associated or not to the cortical membrane bone decalcified (Gen-Derm), Pinheiro et al¹⁶ used five randomized groups to the study: Group I (control), Group IIA (Gen-Ox), Group IIB (Gen-Ox associated to laser), Group IIIA (Gen-Ox associated to Gen-derm) and Group IIIB (Gen - Ox associated to Gen-derm and laser). The animals of the groups submitted to radiation were radiated every 48 hours, totalizing 15 days. The radiation was first instituted immediately to transoperative, and transcutaneous applied at four points around the created bone defect, each section received a total dose of 4 J/cm², Ø 0.6mm, 40 mW. The animals were euthanized at 15th, 21st and 30th days postoperatively and underwent histological analysis, which showed a more advanced bone repair in irradiated groups when compared to control group, with greater bone formation and a quantity of collagen fibers around of inorganic bovine bone graft within the created defect, from 15 days postoperatively, whereas the osteocontuction ability of the graft and the increase in cortical bone when combined with Gen-derm membrane. Thus, the authors concluded that the laser therapy in the established protocol modulated a positive effect on grafted bone defects repair associated or not to the use of biological membranes.

In order to contribute to the study of the effect of biomodulator laser in processes of bone repair and use of bone substitutes, this study has as purpose to evaluate microscopically the influence of laser therapy in defects filled with the α -TCP and β -TCP / HA, when compared to the control group.

Materials and Methods

This study was approved by the ethics committee for animal use of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (CEUA protocol 09/00084).

Animals

30 male rats (Wistar) were used, with 120 days of living, weighing between 250 and 300g kept in the laboratory in the Faculty of Pharmacy, of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul. They were kept in light and dark cycle (12/12 hours)

and controlled temperature ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) and received diet and water ad libitum. The animals were distributed in 2 groups, Test Group (TG) and Control Group (CG). Both groups had 3 times of observation, 7, 14, and 21 days, forming 6 subgroups.

Surgical Procedures

After weighing in the balance of precision, the animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (ketamine ®) 50mg/kg and xylazine hydrochloride (calmiun ®) 5 mg / kg, by intra-peritoneal way, to remain anesthetized throughout the surgical procedure. The rats had the fur cut in the top of the head, the area between the ears. The surgery has been initiated by linear dermoperiosteal coronal incision with the scalpel blade number 15 mounted on cable 3, measuring 1.5 cm in length, between the ears, with support on a bone base. After this procedure, the periosteum was deployed with a detachment of Molt and away with the other tissues, exposing the external surface of the skull.

The places where the cavities were created were previously marked with the aid of an exploratory probe, preserving the median sagittal suture. The two cavities were distributed laterally to the median sagittal suture, with distance of 4 mm apart, measured using an accurate thickness measurer, in the parietal bones. Were made with the aid of an electric motor at low speed and cylindrical drills whose diameter was equal to the size of defects to be created (4mm) under abundant irrigation of saline solution. The insertion of the cement of α -tricalcium phosphate in the form of pulp was carried out with the help of a digger dentin (curette) in the left cavity, as the insertion of the granules of β -tricalcium phosphate / HA with the help of a digger dentin (curette) was made in the right cavity, Figure 1. The α -TCP¹⁰ cement used in this study was synthesized by Labiomat, Laboratory of Biomaterials, School of Materials Engineering, Federal University of Rio Grande do Sul (Porto Alegre-RS). The granules of β -TCP/HA Osteosynt ® used in this study are produced by EINCO Biomaterial Ltda² (Belo Horizonte-MG).

The soft tissues of the head were sutured with 4.0 nylon suture yarn, with interrupted simple points. The area was cleaned with gauze soaked in physiological saline, to remove coagulated blood waste, and the animals were placed in the prone position in their respective cages in order to recover from anesthesia. All animals received a single dose of benzathine penicillin G (20,000 units / kg) intramuscularly,

immediately after surgery and analgesic paracetamol (50 mg / kg) intraperitoneally in the first 3 days after surgery.

Laser therapy

The laser was performed in test groups 7, 14 and 21 days, with laser equipment Arseneto Aluminum Gallium (GaAlAs) Thera Laser® provided by (DMC equipment LTDA).

The application of laser was performed on both sides of the head of the rat, corresponding to the created defects. A distance of 4 mm was measured external ear toward the midline to the parietal bone bilaterally, using a millimeter ruler, where a point was marked with black dermal pen on the animal skin. These markings served as a guide for application of LLLT both in the immediate postoperative period as in other applications.

A wavelength in the infrared spectrum was used, with: 830 nm, 90mw, with 2 J / cm². The laser spot was applied individually in each defect created, two (02) applications, from the immediate postoperative and 2, 4, 6, days after surgery, as well as was considered only the local biomodulator effect of the laser.

Microscopic Analysis

After the postoperative period for each group (TG7 - 07 days; TG14 - 14 days; TG21 - 21 days; CG7 - 7 days; CG14 - 14 days; CG21 – 21 days), the animals were euthanized by continuous inhalation of isoflurane. In order to remove the piece, was performed the weakening of the bones of the skull with a stem-conical drill number 702, at low speed, under constant irrigation with saline solution at a distance of at least four millimeters of the cavity. After this procedure, the osteotomy was completed using a straight chisel, to minimize possible damage in the bone, generated by the friction of the drill.

The specimens were placed in containers previously labelled, containing a solution of 10% formalin and sent to the Pathology Laboratory, Pathology Institute (IPAT) located at Carlos Gomes Avenue, 1973, Porto Alegre (Annex B). For calibration, supervised by experienced pathologist, observed every 20 fields, a single examiner

repeated the observation of a field, comparing the measurements obtained from both observations and applying the test Kappa intraexaminator to verify the accuracy of the measures.

The study of the slides was performed with the use of optical microscopy, envisioning studying the process of bone repair. For this, microscopic increase of 40X was used. Microscopic study aimed to measure the quantity of neoformed bone trabeculae. For this, the slides obtained from each animal were subjected to microscopic examination by the computer system of capture and image analysis - Image J (version 1.41). Under a fixed focus and clarity to the field, the microscope image was captured by a video camera attached to the microcomputer, converted into electrical signal in analogical form and transmitted to the computer screen, where the image was scanned, and consists of a number of *pixels* (1 pixel = 6,5 μm).

After the capture of images in a total of 60 histological sections corresponding to all the study groups (control and test), they were measured by defining the contour of the desired regions, using the mouse cursor, evaluating, this way, the process of evolution of bone repair, by measuring the areas of new bone formation on the total area of the defect, Figure 2.

The values obtained for each trabeculae neoformed bone were transferred to Microsoft Excel for Windows, included in the definitive table and subjected to statistical analysis using the program SPSS for Windows.

Statistical Analysis

The statistical analysis of this work was done through tables, graphs and descriptive statistics (mean and standard deviation) and some statistical tests highlighted below.

For comparison between the laser and control groups (2 groups) was used non-parametric test Mann-Whitney;

For comparison between times 7, 14 and 21 days (3 periods of time) was used non-parametric test Kruskal-Wallis.

Results were considered significant at a maximum level of significance of 5% ($p \leq 0.05$). For processing and analysis of these data the statistical software SPSS version 10.0 was used.

Results

Table 1 summarizes the data observed. Through the results of non-parametric test Mann-Whitney, there was no significant difference between groups in time 7, 14 and 21 (Defect α -TCP) days, however, there is significant difference between groups Laser and Control only in the comparison of 21 days - Defect β - TCP / HA. For this comparison it is seen that the average percentage of new bone formation is significantly higher for the laser group ($p = 0.016$).

Discussion

Several biomaterials are constantly studied to replace the bone tissue to provide a viable alternative to autogenous graft, which, despite being the best and most well accepted bone substitute, has drawbacks, especially the morbidity and the amount of graft available.

The calcium phosphate bioceramics are still being researched and, increasingly, are used in procedures for tissue reconstruction.

There is a variety of types of calcium phosphate, offered for use in Odontology, Medicine and Veterinary Medicine, where their characteristics and physical-chemical properties induce a unique biological response and therefore require specific indication and application^{9,13,19}.

The histomorphometric analysis used enabled the detection of the bone presence in the defect and quantify the size of the area of neoformation. The importance of such analysis is confirmed in studies by Marzouk et al¹² and Eski et al³, who reported to be essential the quantitative analysis for studies aiming to evaluate the effectiveness of new therapeutic modalities in osteogenesis.

The advent of the laser has many benefits for mankind. However, for this is a recent technological advance, the patterns of application on bone tissue require extensive research in this area, aiming to establish parameters of use that contribute to the biomodulator laser effectiveness. The enormous variation on the parameters used in LLLT on the healing process, has hindered the proper interpretation of its effects as well as the diversity of models used. This is because the choice of parameters to define the protocols for the use of the laser is performed according to the experience of the authors, since there are no universally accepted parameters.

In this research, infrared laser of GaAlAs ($\lambda = 830$ nm) was used due to the greater tissue penetration, particularly in the subcutaneous tissues. Radiation procedures performed in this study used the effective dose of 4 J/cm² per session, according to the clinical protocol established by the research line in Laser Odontology of PUCRS, corroborating with the recommendations of Pinheiro et al^{17,16} and Khadra et al¹⁷.

This study demonstrated numerically a more advanced bone repair in irradiated groups when compared to control, with greater bone formation and a quantity of collagen fibers around the graft of α -TCP and β -TCP/HA inside the defect created, from 7 days postoperatively, whereas the osteoconduction ability of the graft. This phenomenon suggests why the frequency of application of the laser therapy, each 48 hours, can be effective when applied during the cell proliferation phase, confirming the studies of Karu⁶; Pinheiro and Gerbi¹⁵ and Weber et al²².

The relationship between laser therapy and autogenous grafts and lyophilized bovine has been described in other studies showing the effectiveness of laser in grafted regions. The results obtained by quantitative descriptive analysis showed that new bone formation was higher in irradiated groups when compared to the control group, showing that the grafting of α -TCP and β -TCP/HA do not interfere with the laser positive biomodulator action, thus, according to the study of Pinheiro et al¹⁷, Gerbi et al⁵, Weber et al²².

Comparing the defects filled with β -TCP/HA for the time of 21 days, there was a significant difference of the irradiated group in comparison to the control group, for this comparison it is seen that the average percentage of new bone formation is significantly higher for the group laser ($p = 0.016$). Table 1

By the results of this research, we can see that the dose of laser therapy with 2 J/cm² at each point, adding 4 J/cm² per session, was efficient in the osteogenesis biomodulation, showing positive results in the irradiated groups. Some studies report the relationship of dose with the biomodulator effect of laser, argued that a higher dose can result in a greater positive laser therapy effect, Silva and Camille²¹. Other studies with variations of dose and biomaterials-related should be encouraged in order to clarify issues related to the dose dependent effect of the laser and its various modes of application.

References

- 1 - Brugnera Junior A et al. Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica. São Paulo: Santos; 2003.
- 2 - Eincobio - *Home Page Osteosynt®*, Descrição da biocerâmica fosfocálcica bifásica micro-macroporosa de β -TCP/HA. [capturado em 2007 oct 27]. Disponível em: <http://www.eincobio.com.br>
- 3 - Eski M et al. Assessment of Distraction Regenerate Using Quantitative Bone Scintigraphy. *Ann Plast Surg.* 2007;58(3):328-34.
- 4 - Fernando S, Hill CM, Walker RA. Randomised double blind comparative study of low level laser therapy following surgical extraction of lower molar teeth. *British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery.* 1993; 31:170-172.
- 5 - Gerbi ME, Pinheiro AL, Marzola C, Limeira Júnior F de A, Ramalho LM, Ponzi EA, et al. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830 nm. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23:382-8.
- 6 - Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Physics, Baltimore.* May 1989; 56(5):691-704.
- 7 - Khadra M et al. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials, Surrey.* 2005; 26:3503-3509.
- 8 - Kolávora H, Ditrichová D, Wagner J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. *Laser in Surgery and Medicine, New York.* 1999; 24:231-235.
- 9 - Kurashina K et al. Calcium phosphate cement: in vitro and in vivo studies of the α -tricalcium phosphate . dicalcium phosphate dibasic . tetracalcium phosphate monoxide system. *Journal Mat. Sci Mat Med.*1995; 6:340-347
- 10 - Labiomat. [capturado em 2007 oct 29]. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/engmat/laboratorios>
- 11 - Macedo NL et al. Bone defect regeneration with bioactive glass implantation in rats. *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB, Bauru.* Abr/jun, 2004; 12(2):137-43.
- 12 - Marzouk MK, Gamal AY, Al-Awady AA, Sharawy MM. Osteoconductive Effects of Vinyl Styrene Microbeads in Rat Calvarial Defects. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65(8):1505-16.
- 13 - Ohura K et al. Resorption of, and bone formation from, new α - tricalcium phosphate . monocalcium phosphate cements: an in vivo study. *Journal of Biomed Mat Res.* 1996; 30:193-200.
- 14 - Peterson LJ et al. Reparação das feridas. In: HUPP, J. R. *Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea.* 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2003. p.57-67.

- 15 - Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomedicine and Laser Surgery*. Larchmont. 2006; 21(2):169-178.
- 16 - Pinheiro ALB et al. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and descalcified cortical bone membrane. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York. Oct 2003; 21(5):301-306.
- 17 - Pinheiro ALB et al. Low-level laser therapy in the management of the maxillofacial region. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, New York. Aug 1998; 16(4):223-226.
- 18 - Roberts WE, Garetto LP. *Fisiologia e Metabolismo Ósseos*. In: MISCH, CE. *Implantes dentários contemporâneos*. 2. ed. São Paulo: Santos; 2000. p. 225-237.
- 19 - Santos LA. *Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado por Fibras para Uso na Área Médico-Odontológica*. Campinas, 2002. Tese (Doutorado em odontologia) – Estadual de Campinas.
- 20 - Silva RV, Camille JA. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. *The Journal of Craniofacial Surgery*, Burlington. 2006; 17(2):297-301.
- 21 - Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Laser in Surgery and Medicine*, New York. 1987; 7:36-45.
- 22 - Weber JBB. et al. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. *Photomedicine and Laser Surgery*, Larchmont. Feb 2006; 24(1):38-44.

Legend

Table 1 – Comparison of percentage and new bone formation between the control and test groups for each type of defect in each period. SD = standard deviation. Source: research data

Figure 1 – Rat skull schema, with created bilateral parietal defects. Source: research data

Figure 2 – Method of reading the slide, an area of neoformed bone. Software Image J, version 1.41. Source: research data

Table 1. Comparison of percentage and new bone formation between the control and test groups for each type of defect in each period. SD = standard deviation. Source: research data (PUCRS, 2009)

Time	Group	n	Average	SD	Average Rank	p
7 days	Defect α - TCP					
	Laser	5	2,57	2,80	6,40	0,421
	Control	5	1,06	2,37	4,60	
	Defect β - TCP/HA					
	Laser	5	3,07	2,14	6,40	0,421
	Control	5	1,94	3,10	4,60	
14 days	Defect α - TCP					
	Laser	5	8,26	6,54	6,20	0,548
	Control	5	6,48	5,00	4,80	
	Defect β - TCP/HA					
	Laser	5	10,79	4,69	6,00	0,690
	Control	5	8,11	5,80	5,00	
21 days	Defect α - TCP					
	Laser	5	22,54	8,62	6,40	0,421
	Control	5	17,54	5,58	4,60	
	Defect β - TCP/HA					
	Laser	5	15,09	9,11	7,80	0,016*
	Control	5	2,53	1,19	3,20	

Figure 1. Rat skull schema, with created bilateral parietal defects. Source: research data (PUCRS, 2009)

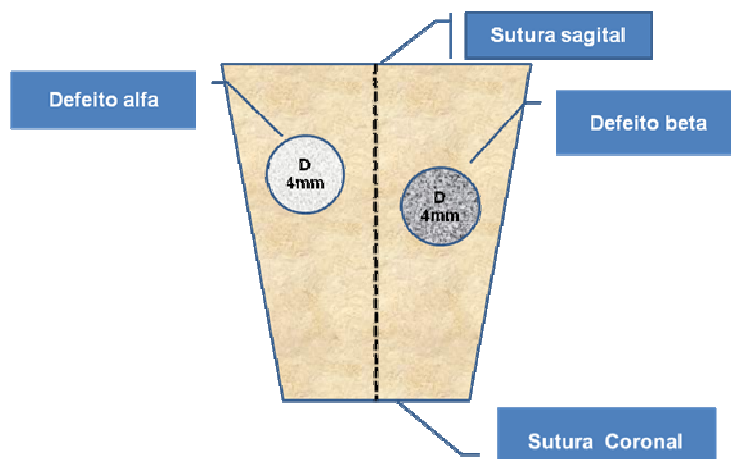
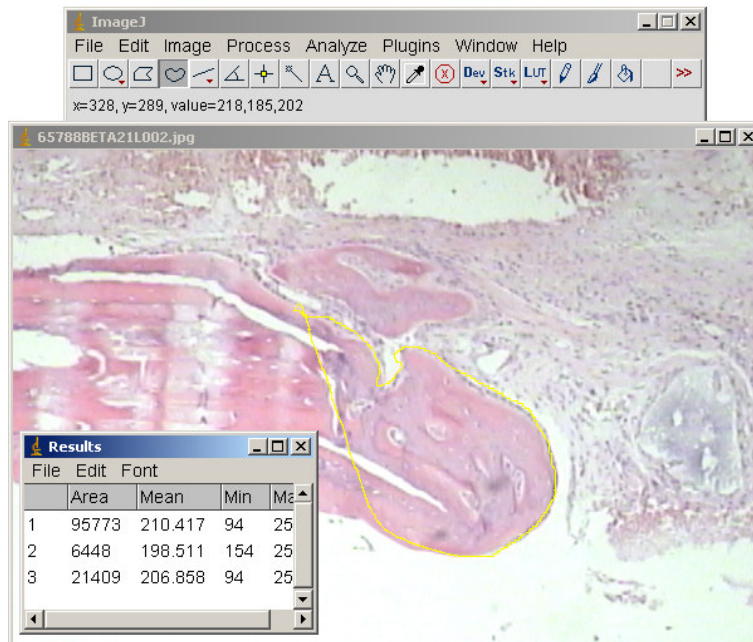


Figure 2. Method of reading the slide, an area of neoformed bone. Software Image J, version 1.41. Source: research data (PUCRS, 2009)



5 DISCUSSÃO

Diversos biomateriais são constantemente estudados para substituir o tecido ósseo, a fim de fornecer uma alternativa viável para o enxerto autógeno que, apesar de ser o melhor e mais bem aceito substituto ósseo, possui desvantagens, principalmente quanto à morbidade e à quantidade de enxerto disponível.

As biocerâmicas de fosfato de cálcio continuam sendo pesquisadas e, cada vez mais, são utilizadas em procedimentos para reconstrução tecidual. Há uma grande variedade de tipos de fosfato de cálcio ofertados para uso na odontologia, Medicina e Medicina Veterinária, sendo que suas características e propriedades físico-químicas induzem uma resposta biológica peculiar e, portanto, requerem indicação e aplicação específicas. Desde o seu surgimento no mercado, as cerâmicas de fosfato de cálcio, especialmente a hidroxiapatita, foram consideradas os materiais por excelência para a remodelação e reconstrução de defeitos ósseos^{37, 38,18}.

Acredita-se que a comparação entre o α -TCP e o β -TCP/HA ao longo do tempo é importante, uma vez que permite verificar qual dos materiais gera osteocondução mais rapidamente permitindo obter previsibilidade no manuseio do osso neoformado. O fator tempo é essencial na aplicação clínica dos CFCs em humanos, particularmente em casos de perdas ósseas e dentárias, nas quais o defeito ósseo é preenchido com o intuito de posterior colocação de implantes dentários. Saber o momento ideal da inserção dos implantes sobre esses materiais é essencial para o prognóstico da reabilitação.

A análise histomorfométrica utilizada permitiu detectar a presença de osso no defeito e quantificar o tamanho da área de neoformação. A importância desse tipo de análise é confirmada nos estudos de Marzouk et al³⁹ e Eski et al⁴⁰, que relatam ser a análise quantitativa essencial para estudos que objetivam avaliar a efetividade de novas modalidades terapêuticas na neoformação óssea.

Os fabricantes do β -TCP/HA relatam que este material é osteoindutor pela sua capacidade de permitir a deposição de proteínas próprias do indivíduo, da quimiotaxia, da capilaridade e das tensões superficiais dos micro-poros de sua geometria, pois a osteogênese é geométrico-dependente, o que também caracteriza a osteoindução intrínseca do produto²¹. Segundo Ducheyne⁴¹, os enxertos β -TCP

são osteocondutores e simultaneamente remodelados por neoformação óssea após algum tempo. Para Shiratori¹⁶, o β -TCP é um composto inorgânico, no qual não existem fatores ou indutores de crescimento e expõem que a liberação de fatores e indutores de crescimento está presente em qualquer tipo de defeito ósseo. A partir das observações dos resultados, acredita-se que a osteoindução não é propriedade intrínseca do β -TCP/HA. Estes grânulos permitem a formação de um arcaçouço para a deposição das células osteoindutoras presentes no organismo.

O advento do *laser* trouxe inúmeros benefícios para a humanidade. Entretanto, por tratar-se de um avanço tecnológico recente, os padrões de aplicação sobre o tecido ósseo demandam exaustivas pesquisas nesta área, com o objetivo de estabelecer parâmetros de utilização que contribuam para a efetividade biomoduladora do *laser*. A enorme variação quanto aos parâmetros utilizados na LLLT em processos de cicatrização, tem dificultado uma interpretação adequada de seus efeitos, bem como a diversidade de modelos usados. Isso porque a escolha dos parâmetros para a definição dos protocolos para a utilização do *laser* é realizada segundo a experiência dos autores, uma vez que não existem parâmetros universalmente aceitos.

A radiação a cada 48h após a confecção do defeito cirúrgico objetivou aguardar a diminuição do processo inflamatório e o início do processo do reparo das feridas cirúrgicas, onde o *laser* parece ser mais efetivo, incrementando as mitoses celulares e criando condições para acelerar o reparo ósseo, como anteriormente descrito por Karu²⁵, Silva Júnior⁴² e Merli et al⁴³.

Nesta pesquisa, utilizou-se o *laser* infravermelho de GaAlAs ($\lambda=830$ nm) pela propriedade de maior penetração tecidual, em especial nos tecidos subcutâneos. Nos procedimentos de radiação executados nesta pesquisa, foi utilizada a dose efetiva de 2 J/cm² por sessão, segundo o protocolo clínico estabelecido pela linha de pesquisa Laser em Odontologia da PUCRS, corroborando com as recomendações de Pinheiro et al^{44, 35} e Khadra et al⁴⁵.

O presente estudo demonstrou numericamente um reparo ósseo mais avançado nos grupos irradiados quando comparados ao controle, com uma maior formação óssea e uma quantidade de fibras colágenas ao redor do enxerto de α -TCP e o β -TCP/HA dentro do defeito criado, a partir dos 7 dias de pós-operatório, considerando a capacidade osteocondutora do enxerto. Este fenômeno sugere o motivo pelo qual a frequência da aplicação da laserterapia, a cada 48 horas, pode

ser efetiva, quando aplicada durante a fase celular proliferativa, confirmando os estudos de Karu²⁵, Pinheiro e Gerbi¹ e Weber et al³⁴.

A relação da terapia laser com enxertos autógenos e bovino liofilizado já havia sido descrita em outros trabalhos, mostrando a eficácia do laser em regiões enxertadas. Os resultados obtidos pela análise descritiva quantitativa demonstraram que a neoformação óssea foi maior nos grupos irradiados quando comparados ao grupo controle, demonstrando que o enxerto de α -TCP e β -TCP/HA não interferem na ação biomoduladora positiva do *laser*, estando assim, de acordo com os estudos de Pinheiro et al³⁵, Gerbi et al⁴⁶, Weber et al³⁴.

Comparando os defeitos preenchidos com β -TCP/HA para o tempo de 21 dias, observou-se uma diferença significativa do grupo irradiado em relação ao grupo controle, para esta comparação observa-se que o percentual médio de neoformação óssea é significativamente superior para o grupo Laser,($p=0,016$).

Tabela 1

Através dos resultados desta pesquisa, podemos observar que a dose de terapia *laser* com 2 J/cm² em cada ponto, somando 4 J/cm² por sessão, foi eficiente na biomodulação da osteogênese, apresentando resultados positivos nos grupos irradiados. Alguns trabalhos relatam a relação da dose com o efeito biomodulador do *laser*, argumentando que uma dose mais alta pode resultar num efeito positivo maior terapia *laser*, Silva e Camilli²⁶. Outros trabalhos com variações de dose e relacionados com biomateriais devem ser incentivados, a fim de tentar elucidar questões relacionadas ao efeito dose dependente do laser e de seus variados modos de aplicação.

O uso potencial dos *lasers* na biomodulação da osteogênese através de suas propriedades fotoquímicas e fotobiológicas são estudados por vários pesquisadores em todo o mundo, contudo, a literatura evidencia que o mecanismo regulador do reparo ósseo sob a influência da LLLT ainda permanece incerto. Detalhados e específicos estudos de deverão solidificar os resultados obtidos no presente trabalho, objetivando assim, o aprofundamento dos efeitos biomoduladores positivos vistos nesta pesquisa. O advento de novas tecnologias na área, poderão definir melhores resultados da laserterapia na biomodulação de processo de reparo no tecido ósseo.

REFERENCIAS

1. Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomedicine and Laser Surgery*. Larchmont. 2006; 21 (2): 169-178.
2. Peterson LJ et al. Reparação das feridas. In: HUPP, J. R. *Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2003. p. 57-67.
3. Roberts WE, Garetto LP. Fisiologia e Metabolismo Ósseos. In: MISCH, CE. *Implantes dentários contemporâneos*. 2. ed. São Paulo: Santos; 2000. p. 225-237.
4. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, Philadelphia. Apr. 1986; (205): 299-308.
5. Sirola, K. Regeneration in defects in the calvaria. An experimental study. *Annals of Medicine and Experimental Biology of Finland*. 1960; 38 (1), suppl 2.
6. Mulliken JB, Glowacki, J. Induced Osteogenesis for Repair and Construction in the Craniofacial Region. *Plast Reconstr Surg*. 1980; 65 (5):553-59.
7. Turnbull RS, Freeman E. Use of wounds in the parietal bone of the rat for evaluating bone marrow for grafting into periodontal defects. *J eriodont. Res*. 1974; 9 (39).
8. Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann. Surg*. 1982; 196 (100).
9. Macedo NL et al. Bone defect regeneration with bioactive glass implantation in rats. *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB, Bauru*. Abr/jun, 2004; 12 (2):137-43.
10. Zago AZ, Covas DT. Células-tronco a nova fronteira da medicina. São Paulo. Ed. Atheneu; 2006. p. 35-42.
11. Den Boer FC, Wippermann BW, Blokhuis T.J et al. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. *J. Orthop. Res*. 2003; 21: 521-528, 2003.
12. Ousterhout DK, Stelnicki EJ. Plastic surgery s plastics. *Clinics in Plastic Surgery*, [s.l.]. Jan. 1996; 23 (1):183-190,
13. Valerio P et al. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*, [s.l.]. Jul. 2004; 25(15):2941-2948.

14. Knabe C et al. The effect of bioactive glass ceramics on the expression of bone-related genes and proteins in vitro. *Clinical Oral Implants Research*, Copenhagen. 2005; 16:119-127.
15. Nasr HF, Aichelmann-Reidy, ME, Yukna RA. Bone and bone substitutes. *Periodontology*, Copenhagen, Fev. 2000; 9:74-86.
16. Shiratori K, Matsuzaka K, Koike Y, Murakami S, Shimono M, Takashi I. Bone formation in β - tricalcium phosphate-filled bone defects of the rat femur: Morphometric analysis and expression of bone related protein m RNA. *Biomedical Research*. 2005; 26(2):51-59.
17. Like X, Monroe EA. Calcium Phosphate Dental Cements. *Mat Res Soc Symp Proc*. 1991; 179:25-39.
18. Santos LA. Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado por Fibras para Uso na Prea MØdico-Odontol gica. Campinas, 2002. Tese (Doutorado em odontologia) – Estadual de Campinas.
19. Li Y, Weng W, Tam KC. Novel highly biodegradavel biphasic tricalcium phosphates composed of α - tricalcium phosphate and β - tricalcium phosphate. *Acta Biomaterialia*, 2006; 1-4.
20. Chow LC. Calcium Phosphate Materials: Reactor Response. *Adv Dent Res*, Aug. 1998; 2 (1):181-4.
21. Encobio - Home Page Osteosyntfi, Descri aõ da biocer mica fosfo cálcica bifásica micro-macroporosa de β -TCP/HA. [capturado em 27 out 2007] Disponível em: <http://www.encobio.com.br>.
22. Brugnera Junior A, Pinheiro ALB. Lasers na odontologia moderna. São Paulo: Pancast; 1998.
23. Kert J, Rose L. Clinical laser therapy: low level laser therapy. Copenhagen: Scandinavian Medical Laser Technology; 1989.
24. Brugnera Junior A et al. Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica. São Paulo: Santos; 2003.
25. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Physics*, Baltimore. May 1989; 56(5):691-704.
26. Silva RV, Camilli JA. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. *The Journal of Craniofacial Surgery*, Burlington. 2006; 17 (2):297-301.
27. Kolávora H, Ditrichová D, Wagner J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. *Laser in Surgery and Medicine*, New York. 1999; 24:231-235.

28. Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidates master with low-power laser. *Laser in Surgery and Medicine*, New York. 1987; 7: 36-45.
29. Fernando S, Hill CM, Walker RA. Randomised double blind comparative study of low level laser therapy following surgical extraction of lower molar teeth. *British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*. 1993; 31:170-172.
30. Barushka O et al. Effect of Low energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. *Bone*, New York. 1995; 16: 47-55.
31. Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in rat. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, St. Louis. May 1997; 111(5): 525-532.
32. Ozawa Y. Low-power laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarian cells. *Bone*, New York. 1998; 22(4):347-354.
33. Freitas IGF.; Barauska SV, Cruz-Höfling MA. Laser effects on osteogenesis. *Applied Surface Science*, Amsterdam. Feb 2000; 154/155:548-554.
34. Weber JBB. et al. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. *Photomedicine and Laser Surgery*, Larchmont. Feb 2006; 24 (1):38-44.
35. Pinheiro ALB et al. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and descalcified cortical seus membrane. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York. Oct 2003; 21(5):301-306.
36. Khadra M. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials*, Surrey. 2005; 26:3503-3509.
37. Kurashina K et al. Calcium phosphate cement: in vitro and in vivo studies of the \langle-tricalcium phosphate . dicalcium phosphate dibasic . tetracalcium phosphate monoxide system. *Journal Mat. Sci Mat Med*.1995; 6:340-347.
38. Ohura K et al. Resorption of, and bone formation from, new \langle- tricalcium phosphate . monocalcium phosphate cements: an in vivo study. *Journal of Biomed Mat Res*. 1996; 30:193-200.
39. Marzouk MK, Gamal AY, Al-Awady AA, Sharawy MM. Osteoconductive Effects of Vinyl Styrene Microbeads in Rat Calvarial Defects. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 65(8):1505-16.
40. Eski M et al. Assessment of Distraction Regenerate Using Quantitative Bone Scintigraphy. *Ann Plast Surg*. 2007;58(3):328-34.
41. Ducheyne P, De Groot K. *In vivo* surface activity of a hydroxyapatite alveolar bone substitute. *J Biomed Mater Research*.1981; 15:441-45.

42. Silva Júnior AN, Pinheiro AL, Oliveira MG, Weismann R, Ramalho LM, 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.* 2002; 20:83-7.
43. Merli LA, Santos MT, Genovese WJ, Faloppa F. Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23:212-5.
44. Pinheiro ALB et al. Low-level laser therapy in the management of the maxillofacial region. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery, New York.* Aug 1998; 16(4):223-226.
45. Khadra M et al. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials, Surrey.* 2005; 26:3503-3509.
46. Gerbi ME, Pinheiro AL, Marzola C, Limeira Júnior F de A, Ramalho LM, Ponzi EA, et al. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830 nm. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23:382-8.

ANEXOS

ANEXO A – Pareceres dos Comitês de Ética

ANEXO B – Análises estatísticas

ANEXO C – Tabelas

ANEXO D – Gráficos

ANEXO E – Figuras

ANEXO F – Normas para a entrega de trabalho de conclusão de dissertação/tese

PARECERES DOS COMITÊS DE ÉTICA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS



Ofício 036/09 - CEUA

Porto Alegre, 06 de abril de 2009.

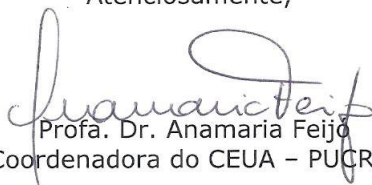
Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 09/00084, intitulado: **"Efeito da laserterapia na biomodulação da osteogênese em defeitos críticos preenchidos com cimento de A- Fosfato tricálcico criados em calota craniana de ratos"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios do andamento do projeto devem ser entregues a este Comitê.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Anamaria Feijó
Coordenadora do CEUA - PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli
Faculdade de Odontologia
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar sala 314- CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS



Questões levantadas pelo CEUA – PUCRS

O projeto está bem escrito, tem objetivos bem claros e será conduzido de forma eticamente adequada

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar sala 314- CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 16 de março de 2009

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0098/08
Intitulado: Efeito da laserterapia sobre a osteogênese em defeitos críticos preenchidos com cimento de alfa-TCP e grânulos de beta-TCP/HA confeccionados em calota craniana de ratos
Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli
Pesquisadores Associados André Luiz Marinho Falcão Gondim
Nível: Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 11 de março de 2009.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS

Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior
 Presidente da Comissão Científica e de Ética da
 Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Tempo = 7 dias

Group Statistics ^a

	Grupo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Defeito Alfa	Laser	5	2,57	2,80	1,25
	Grupo Controle	5	1,06	2,37	1,06
Defeito Beta	Laser	5	3,0680	2,1440	,9588
	Grupo Controle	5	1,9420	3,1021	1,3873

a. Tempo = 7 dias

Tempo = 14 dias

Group Statistics ^a

	Grupo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Defeito Alfa	Laser	5	8,26	6,54	2,92
	Grupo Controle	5	6,48	5,00	2,24
Defeito Beta	Laser	5	10,7900	4,6897	2,0973
	Grupo Controle	5	8,1080	5,7966	2,5923

a. Tempo = 14 dias

Tempo = 21 dias

Group Statistics ^a

	Grupo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Defeito Alfa	Laser	5	22,54	8,62	3,85
	Grupo Controle	5	17,54	5,58	2,50
Defeito Beta	Laser	5	15,0940	9,1056	4,0721
	Grupo Controle	5	2,5280	1,1949	,5344

a. Tempo = 21 dias

Tempo = 7 dias**Mann-Whitney Test**

Ranks ^a

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Defeito Alfa	Laser	5	6,40	32,00
	Grupo Controle	5	4,60	23,00
	Total	10		
Defeito Beta	Laser	5	6,40	32,00
	Grupo Controle	5	4,60	23,00
	Total	10		

a. Tempo = 7 dias

Test Statistics ^{b,c}

	Defeito Alfa	Defeito Beta
Mann-Whitney U	8,000	8,000
Wilcoxon W	23,000	23,000
Z	-1,059	-,952
Asymp. Sig. (2-tailed)	,290	,341
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,421 ^a	,421 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Grupo

c. Tempo = 7 dias

Tempo = 14 dias**Mann-Whitney Test**

Ranks ^a

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Defeito Alfa	Laser	5	6,20	31,00
	Grupo Controle	5	4,80	24,00
	Total	10		
Defeito Beta	Laser	5	6,00	30,00
	Grupo Controle	5	5,00	25,00
	Total	10		

a. Tempo = 14 dias

Test Statistics ^{b,c}		
	Defeito Alfa	Defeito Beta
Mann-Whitney U	9,000	10,000
Wilcoxon W	24,000	25,000
Z	-,731	-,522
Asymp. Sig. (2-tailed)	,465	,602
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,548 ^a	,690 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Grupo

c. Tempo = 14 dias

Tempo = 21 dias

Mann-Whitney Test

Ranks ^a				
	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Defeito Alfa	Laser	5	6,40	32,00
	Grupo Controle	5	4,60	23,00
	Total	10		
Defeito Beta	Laser	5	7,80	39,00
	Grupo Controle	5	3,20	16,00
	Total	10		

a. Tempo = 21 dias

Test Statistics ^{b,c}		
	Defeito Alfa	Defeito Beta
Mann-Whitney U	8,000	1,000
Wilcoxon W	23,000	16,000
Z	-,940	-2,402
Asymp. Sig. (2-tailed)	,347	,016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,421 ^a	,016 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Grupo

c. Tempo = 21 dias

Grupo = Laser

Descriptive Statistics^a

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Defeito Alfa	15	0	35	11,12	10,55
Defeito Beta	15	,00	26,24	9,6507	7,6031
Valid N (listwise)	15				

a. Grupo = Laser

Grupo = Grupo Controle**Descriptive Statistics^a**

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Defeito Alfa	15	0	27	8,36	8,25
Defeito Beta	15	,00	14,88	4,1927	4,5860
Valid N (listwise)	15				

a. Grupo = Grupo Controle

Grupo = Laser**Descriptives^a**

		N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Defeito Alfa	7 dias	5	2,57	2,80	0	6
	14 dias	5	8,26	6,54	3	16
	21 dias	5	22,54	8,62	12	35
	Total	15	11,12	10,55	0	35
Defeito Beta	7 dias	5	3,0680	2,1440	,00	5,29
	14 dias	5	10,7900	4,6897	6,54	17,55
	21 dias	5	15,0940	9,1056	4,51	26,24
	Total	15	9,6507	7,6031	,00	26,24

a. Grupo = Laser

Grupo = Grupo Controle

Descriptives^a

		N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Defeito Alfa	7 dias	5	1,06	2,37	0	5
	14 dias	5	6,48	5,00	1	12
	21 dias	5	17,54	5,58	14	27
	Total	15	8,36	8,25	0	27
Defeito Beta	7 dias	5	1,9420	3,1021	,00	7,35
	14 dias	5	8,1080	5,7966	1,84	14,88
	21 dias	5	2,5280	1,1949	1,86	4,65
	Total	15	4,1927	4,5860	,00	14,88

a. Grupo = Grupo Controle

NPar Tests

Grupo = Laser

Kruskal-Wallis Test

Ranks^a

		Tempo	N	Mean Rank
Defeito Alfa	7 dias		5	4,00
	14 dias		5	7,40
	21 dias		5	12,60
	Total		15	
Defeito Beta	7 dias		5	3,20
	14 dias		5	9,80
	21 dias		5	11,00
	Total		15	

a. Grupo = Laser

Test Statistics^{a,b,c}

	Defeito Alfa	Defeito Beta
Chi-Square	9,397	8,820
df	2	2
Asymp. Sig.	,009	,012

- a. Kruskal Wallis Test
 b. Grouping Variable: Tempo
 c. Grupo = Laser

Grupo = Grupo Controle

Kruskal-Wallis Test

Ranks^a				
	Tempo	N	Mean Rank	
Defeito Alfa	7 dias	5	3,40	
	14 dias	5	7,60	
	21 dias	5	13,00	
	Total	15		
Defeito Beta	7 dias	5	4,40	
	14 dias	5	11,40	
	21 dias	5	8,20	
	Total	15		

a. Grupo = Grupo Controle

Test Statistics			
	a,b,c		
	Defeito Alfa	Defeito Beta	
Chi-Square	11,791	6,151	
df	2	2	
Asymp. Sig.	,003	,046	

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Tempo

c. Grupo = Grupo Controle

TABELAS

Tabela 1. Comparação do percentual e neoformação óssea entre os tempos 7, 14 e 21 dias para cada tipo de defeito em cada grupo

<i>Grupo</i>	<i>Tempo</i>	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Laser	Defeito α - TCP					
	7 dias	5	2,57	2,80	4,00 ^A	0,009
	14 dias	5	8,26	6,54	7,40 ^A	
	21 dias	5	22,54	8,62	12,60 ^C	
	Defeito β - TCP/HA					
	7 dias	5	3,07	2,14	3,20 ^A	0,012
14 dias	5	10,79	4,69	9,80 ^B		
21 dias	5	15,09	9,11	11,00 ^B		
Controle	Defeito α - TCP					
	7 dias	5	1,06	2,37	3,40 ^A	0,003
	14 dias	5	6,48	5,00	7,60 ^B	
	21 dias	5	17,54	5,58	13,00 ^C	
	Defeito β - TCP/HA					
	7 dias	5	1,94	3,10	4,40 ^A	0,046
14 dias	5	8,11	5,80	11,40 ^B		
21 dias	5	2,53	1,19	8,20 ^B		

DP = desvio-padrão

* Ranks Médios seguidos de mesma letra não diferem entre si

GRÁFICOS

Gráfico 1. Comparação do percentual e neoformação óssea entre os grupos Controle e Teste para cada tipo de defeito em cada período de tempo.

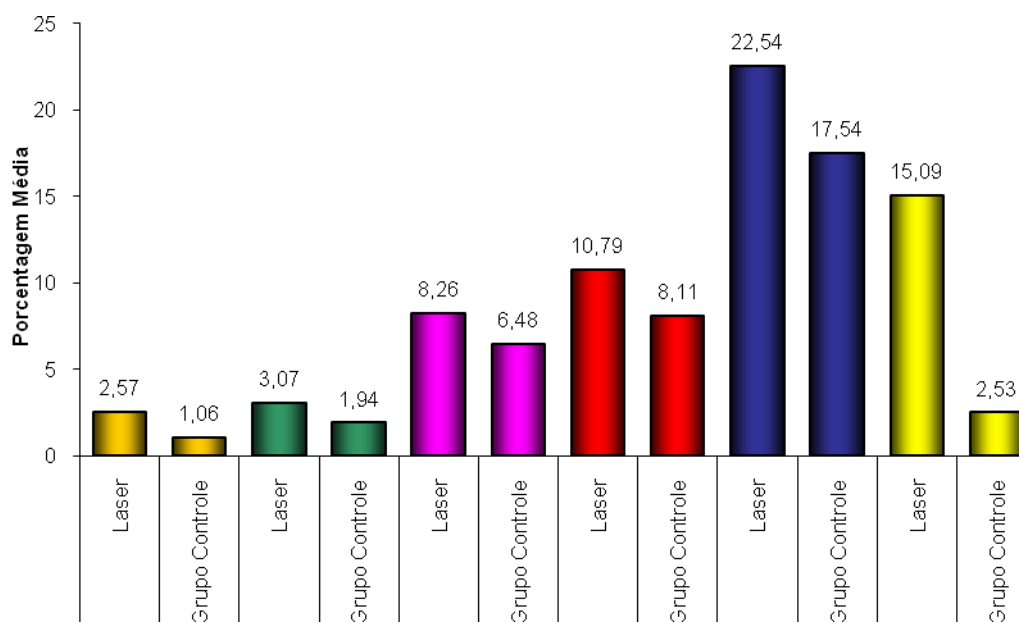
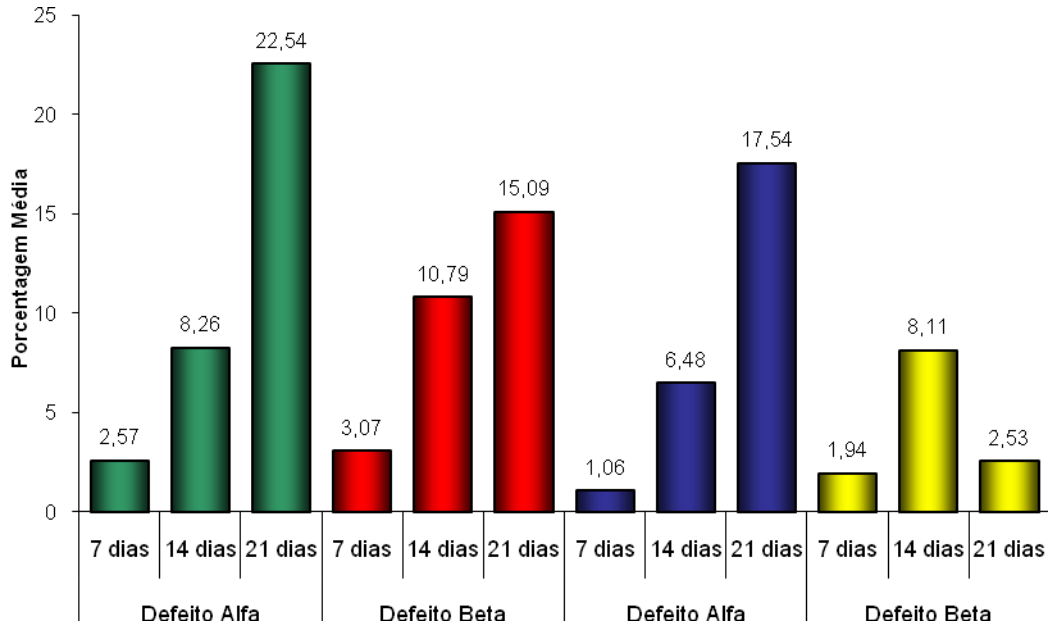


Gráfico 2. Comparação do percentual e neoformação óssea entre os tempos 7, 14 e 21 dias para cada tipo de defeito em cada grupo



FIGURAS

Figura 1: Peça removida do grupo laser 21 dias. Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS2009).

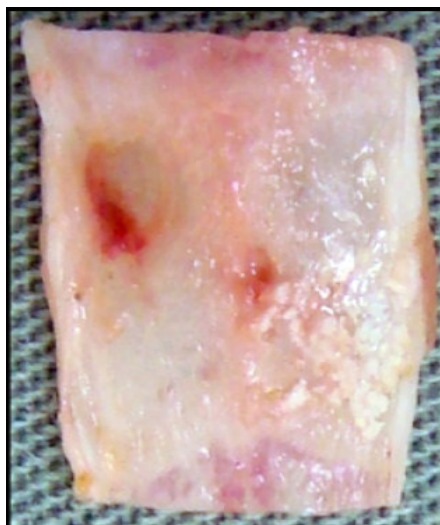


Figura 2: Corte na sutura sagital para preparo das lâminas. Fonte: Dados da Pesquisa (PUCRS, 2009).



Figura 3: Esquema de corte das peças para confecção das lâminas. Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS,2009).

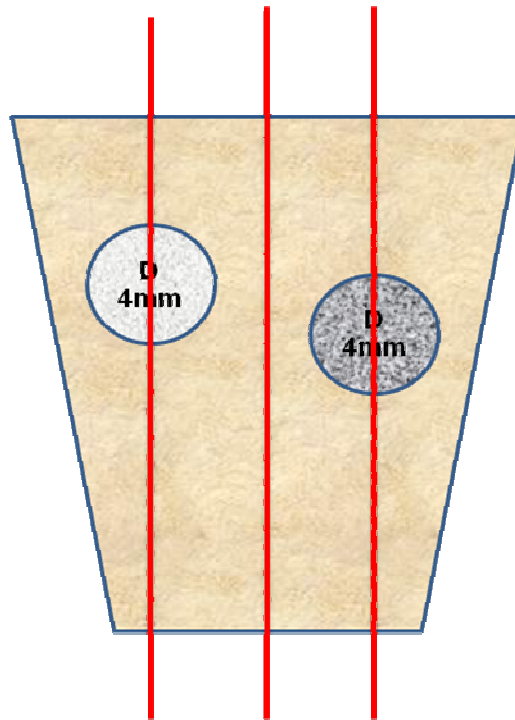
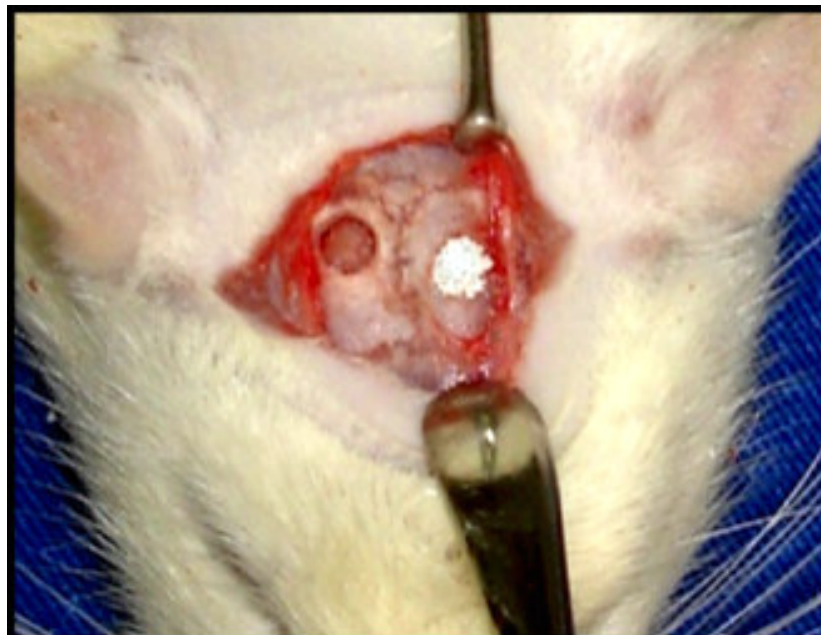


Figura 4: Transoperatório mostrando as cavidades confeccionadas e inserção do biomaterial. Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS,2009).



NORMAS PARA A ENTREGA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE DISSERTAÇÃO/TESE



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO

Normas para a entrega de trabalho de conclusão de dissertação/tese

(Válido a partir de agosto de 2008)

1. Características gerais

A apresentação de trabalho de conclusão de dissertação de Mestrado ou tese de Doutorado é requisito obrigatório para conclusão do curso de Mestrado ou Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS. O mesmo deverá ser apresentado perante uma Comissão Examinadora, seguindo o Regulamento do Pós-Graduação.

2. Objetivo

A apresentação de trabalho de conclusão visa examinar se o candidato possui conhecimento e maturidade científica adequados sobre o trabalho desenvolvido, e domínio dos aspectos técnicos e teóricos relacionados ao problema que se dispôs a discorrer. O trabalho escrito deve refletir este perfil do candidato.

3. Detalhamento do trabalho

3.1. Carta de submissão

O candidato deverá entregar o trabalho na Secretaria de Pós-graduação, anexando carta contendo o título proposto, linha de pesquisa e assinatura do (a) Orientador(a). O Coordenador do Programa dará ciência do recebimento do mesmo. A entrega deverá ser feita, no mínimo, 30 dias antes da defesa de dissertação/tese.

3.2. Características do trabalho

O trabalho deverá ser apresentado, prioritariamente, sob a forma de artigo(s) científico(s), contendo os seguintes subitens:

- a. Título:** O título deverá apresentar, sucintamente, o problema que o autor se propõe a discorrer.
- b. Introdução (ou Apresentação):** o autor deverá apresentar o problema, considerando os antecedentes em relação ao tema, as dúvidas existentes, e a proposta do(s) estudo(s).
- c. Artigo(s) científico(s):** o autor deverá anexar pelo menos um trabalho científico **aceito** ou **publicado**, ou dois trabalhos



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO

científicos **submetidos**, sendo que o(s) mesmo(s) deverá(ao) ser, no mínimo, Qualis B3 Nacional para o Mestrado, e Qualis B1 Internacional ou superior para o Doutorado. Artigos adicionais podem ser inseridos, sem restrição de Qualis. No caso de artigos submetidos, a carta de recebimento da submissão por parte do editor deve ser anexada.

- d. Discussão geral:** o autor deve, nesta secção, explorar o contexto do problema, e de que maneira a(s) obra(s) contribui(em) para equacionar o problema, ou que novas perguntas/hipóteses podem ser formuladas para futuros desenvolvimentos.
- e. Referências bibliográficas:** referências bibliográficas adicionais são incorporadas às referências contidas nos artigos. Toda referência citada no trabalho deve ser relacionada.

Alternativamente, o aluno poderá apresentar o trabalho sob a forma de monografia, da maneira tradicional. Neste caso, o aluno deverá também submeter pelo menos um artigo científico, obedecendo aos mesmos critérios acima descritos.

4. Julgamento

O julgamento do trabalho apresentado compete à Comissão Examinadora, seguindo o Regulamento do Pós-Graduação.

Porto Alegre, maio de 2008.

José Antonio Poli de Figueiredo
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia