



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA**

LANA SARITA DE SOUZA OLIVEIRA

**USO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE COMBINADO A
ESPONJA DE COLÁGENO EM UM MODELO DE REPARO ÓSSEO**

NATAL/RN

2015

Lana Sarita de Souza Oliveira

USO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE COMBINADO A ESPONJA
DE COLÁGENO EM UM MODELO DE REPARO ÓSSEO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Sandro Pereira da Silva.
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Aurigena Antunes de Araújo

NATAL/RN

2015

Catálogo na Fonte. UFRN/ Departamento de Odontologia
Biblioteca Setorial de Odontologia “Prof. Alberto Moreira Campos”

Oliveira, Lana Sarita Souza de.

Uso do laser de baixa intensidade combinado a esponja de colágeno em um modelo de reparo ósseo/ Lana Sarita de Souza Oliveira. – Natal, RN, 2015. 53f. : il.

Orientador: José Sandro Pereira da Silva

Co-Orientadora: Profª Drª Aurigena Antunes de Araújo

Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Departamento de Odontologia. Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva.

1. Terapia a laser de baixa intensidade – Dissertação. 2. Regeneração óssea – Dissertação. 3. Colágeno – Dissertação. I. Silva, José Sandro Pereira da. II. Título.

RN/UF/BSO

Black D76

LANA SARITA SOUZA DE OLIVEIRA

USO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE COMBINADO A ESPONJA DE
COLÁGENO EM UM MODELO DE REPARO ÓSSEO

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. José Sandro Pereira da Silva, UFRN
Orientador

Prof. Dr. Hécio Henrique Araújo Moraes, UERN
Examinador Externo à Instituição

Prof Dr. Carlos Augusto Galvão Barbosa, UFRN
Examinador Interno

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho em primeiro lugar a Deus que me deu toda força necessária para continuar nos momentos mais difíceis, e aos meus pais, que me deram todo apoio para chegar até aqui e nunca desistiram de mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu forças para não desistir, perseverança para lutar por este sonho que se concretiza. Nos momentos mais difíceis me deu paciência, compreensão e esperança de que tudo iria dar certo da melhor forma possível.

Agradeço a minha mãe, Kerma Keller, que com toda sua bondade e amor me ajudou a cuidar dos meus ratinhos, esteve comigo quando precisei do seu apoio físico e moral. Não me deixou desistir nem por um segundo e me impulsionava quase todos os dias e correr atrás, lutar e vencer esse desafio que foi meu mestrado. E ao meu pai, Valdo Dantas, que me apoio quando precisei que fosse comigo resolver os problemas do mestrado. E que de seu jeito estava torcendo por mim para que vencesse mais essa etapa.

Agradeço ao meu namorado, Antônio Camargo, que mesmo quando distante me ajudava com palavras de calma, me apoiava nas minhas decisões e nunca deixou que eu desistisse dos meus sonhos, se fez presente me dando forças para seguir sempre em frente e nunca me deixar abalar.

Agradeço a equipe técnica, Dona Neida e Lurdinha, que sem elas eu não teria conseguido, sem o conhecimento e as técnicas que me ensinaram não estaria aqui hoje. Sou muito grata pela disponibilidade que me deram, pela mão amiga que me ensinou tudo que fiz e sei na prática.

Agradeço ao meu orientador, José Sandro, que me ensinou e me ajudou no que coube a ele, e que mesmo diante das dificuldades não me abandonou e me incentivou a continuar. Agradeço ainda a minha co-orientadora, Aurigena Antunes, que apareceu para resolver a minha vida no momento mais complicado do meu mestrado, e com seu incentivo me fez prosseguir.

Agradeço ainda ao professor Raimundo Junior, que me ajudou a realizar uma grande parte do meu trabalho, sem o conhecimento dele não as teria feito.

Obrigada, ainda, as minhas amigas que estiveram sempre me incentivando e na torcida do meu título.

RESUMO

Introdução: O presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito da laserterapia de baixa intensidade combinada com arcabouço de esponja de colágeno na cicatrização de um defeito crítico na calvária de ratos. **Metodologia:** Estudo experimental, prospectivo e *in vivo*. Foram utilizados 45 ratos Wistar, divididos em cinco grupos. O grupo G0: foi o grupo controle positivo (com defeito e sem tratamento); O grupo G1: foi o grupo tratado com esponja de colágeno (Hemospon®); O grupo G2: foi o grupo tratado apenas com laser; O grupo G3: foi o grupo tratado com esponja de colágeno e laser. O laser foi utilizado na dosagem de 120J/cm² (potência de 50mW, tempo de exposição de 10 s), comprimento de onda de 780nm, aplicações realizadas em quatro pontos, após o procedimento e a cada 48hrs, duas vezes. O defeito de 5mm foi realizado na calvária, e após 21 e 30 dias foram feitas avaliações através de raio x, lâminas histológicas e imunohistoquímica (RANK, OPG, TGF- β e FGF-2). **Resultados:** Através dos resultados radiográficos o grupo que apresentou mais área radiopaca foi o G3 de 30 dias. Para as análises histológicas o grupo G3 de 30 dias apresentou mais formação de osso novo, com menor infiltrado inflamatório e grande quantidade de osteóide. Para a avaliação imunohistoquímica foram usadas apenas as lâminas do G3 de 30 dias e G0 de 30 dias, pois houve uma diferença significativa entre esses grupos, e observou-se maior marcação de OPG, indicando a reconstrução do tecido ósseo. **Conclusão:** Observou-se que a terapia a laser de baixa intensidade combinada ao arcabouço de colágeno apresentou resultados positivos para regeneração óssea no período de 30 dias.

Descritores: Terapia a laser de baixa intensidade. Regeneração Óssea. Colágeno.

ABSTRACT

Aim: The aim was to evaluate the effect of laser therapy combined with collagen sponge scaffold in the healing of a cranial critical defect in rats. **Methods:** Experimental study, prospective, *in vivo*. Forty five Wistar rats were divided into 5 groups. The G0 group was the positive control group (with defective and no treatment); The group G1 with defective was treated with collagen sponge; the group G2 with defective was treated only with laser ; The G3 group with defective was the group treated with collagen and laser sponge; Group C was the negative control group (no bone defect and without treatment). The laser was used at a dosage of 120J / cm² (50 mW power, exposure time 10 sec), wavelength 780nm, applications performed on 4 points after the procedure, and every 48 h twice. The defect of 5mm was held in the skull, and after 21 and 30 days the evaluations were made by x-ray, histological slides and immunohistochemistry (RANK, OPG, TGF- β and FGF-2). **Results:** Through the radiographic findings the group had more radiopaque area was the G3 30 days. For histological analyzes the G3 30 days had more new bone formation, with less inflammatory infiltrate and large amount of osteoid. For immunohistochemical analysis were used only G3 blades 30 days and G0 30 days because there was a significant difference between these groups, and there was a higher markup OPG, indicating the reconstruction of bone tissue. **Conclusion:** It was observed that the combined low-level laser therapy to the collagen scaffold showed positive results for bone regeneration within 30 days.

Descriptors: Laser Therapy Low-Level. Bone Regeneration. Collagen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Defeito crítico de 5 mm em calvária de rato, Natal/RN, 2015.....	27
Figura 2	Defeito preenchido com esponja de colágeno. Natal/RN, 2015....	28
Figura 3	Imagens radiográficas de um exemplar de cada grupo. Natal/RN, 2015.....	32
Figura 4	Imagens das lâminas histológicas de um exemplar de cada grupo. Natal/RN, 2015.....	36
Figura 5	Imagens das lâminas da imunohistoquímica de um exemplar de cada grupo, Natal/RN, 2015.....	37
Gráfico 1	Representa o reparo ósseo dos grupos através da análise radiográfica. Natal/RN, 2015.....	31
Gráfico 2	Representa o reparo ósseo dos grupos de 21 dias através das análises histológicas. Natal/RN, 2015.....	35
Gráfico 3	Representa o reparo ósseo dos grupos de 30 dias através das análises histológicas. Natal/RN, 2015.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupos do experimento. Natal/RN, 2015.....	26
Tabela 2	Escore de Raio X. Natal/RN, 2015.....	28
Tabela 3	Pontuações atribuídas aos diferentes eventos histológicos. Natal/RN, 2015.....	29
Tabela 4	Porcentagem de reparo.....	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO LITERÁRIA.....	14
2.1	REGENERAÇÃO ÓSSEA.....	14
2.2	REMODELAÇÃO ÓSSEA.....	16
2.3	MODELO DE REPARO ÓSSEO.....	16
2.4	ESPONJA DE COLÁGENO.....	18
2.5	LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE.....	21
3	OBJETIVOS.....	25
3.1	OBJETIVO GERAL.....	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4	METODOLOGIA.....	26
4.1	DESENHO DO ESTUDO.....	26
4.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	26
4.3	CRIAÇÃO DO DEFEITO CRÍTICO.....	27

4.4	ANÁLISE RADIOGRÁFICA.....	28
4.5	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	29
4.6	ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	30
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	30
4.7.1	Raio x.....	30
4.7.2	Histologia.....	30
4.7.3	Imunohistoquímica.....	30
5	RESULTADOS.....	31
5.1	RADIOGRAFIAS.....	31
5.2	ANÁLISE HISTOLOGICA.....	33
5.3	IMUNOHISTOQUÍMICA.....	37
6	DISCUSSÃO.....	38
7	CONCLUSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS.....	44
	ANEXOS.....	51

1 INTRODUÇÃO

Um grande número de lesões ósseas ocorre frequentemente na população, em grande parte ocasionando perda óssea significativa (PEREZ-SANCHEZ et al., 2010; HABIBOVIC, 2007).

O tratamento dessas lesões é baseado na utilização de enxertos ósseos autógenos e/ou xenógenos. As limitações associadas a esse procedimento como aumento de morbidade cirúrgica, baixa disponibilidade de enxerto, custos hospitalares, limitação do volume ósseo, maior tempo de recuperação do paciente, dentre outros, faz com que sejam estimulados esforços na busca de substitutos ósseos com capacidade de utilização clínica (PEREZ-SANCHEZ, et al., 2010).

O desenvolvimento de biomateriais tem levado a descoberta de novos produtos com tal finalidade de substituir o tecido lesionado. Uma das opções tem sido a utilização de arcabouços biológicos para auxiliar no processo de cicatrização de ferimentos, usados isoladamente ou em associação a outros procedimentos que estimulem o reparo (STEVENS, 2008; PEREZ-SANCHEZ, et al., 2010).

Os biomateriais são materiais artificiais desenvolvidos para uso em áreas da saúde com finalidade de substituir a matéria viva cuja função foi perdida. Um biomaterial é qualquer substância sintética ou natural que pode ser utilizada como tratamento para substituir total ou parcialmente qualquer tecido, ou órgão do organismo. Excluem-se, aqui, os fármacos ou combinações de substâncias (GUASTALDI, 2004).

As funções de um arcabouço são manter um espaço tridimensional para as células, auxiliar na diferenciação celular e eventualmente guiar a organização celular em uma arquitetura definida. Como o arcabouço desempenha um papel importante na taxa de sucesso e qualidade de engenharia de tecidos, é necessário explorar materiais apropriados (STEVENS, 2008.)

O colágeno, por exemplo, é a proteína mais abundante no corpo e está presente como componente da matriz extracelular. Na sua forma sintética, é considerado um dos biomateriais mais úteis para estimular a expressão dos fatores de crescimento ósseo, devido a sua excelente biocompatibilidade. (MARALDI, 2013).

As esponjas de colágeno podem ser usadas como arcabouços para apoiar os osteoblastos e estimular a reparação óssea, pois além da sua biocompatibilidade, apresentam uma boa flexibilidade e são biodegradáveis (KIM; KIM; LEE, 2013).

O colágeno que está presente no osso é do tipo I, similar ao encontrado na pele e nos tendões, mas pode ser observada, também, a presença do colágeno tipo II (cartilagem), nos estágios tardios de união óssea das cicatrizações dos ossos fraturados de origem endocondral, através do calo ósseo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Deste modo, arcabouços de colágenos supostamente podem ser uma alternativa no reparo ósseo.

O uso da terapia de laser de baixa intensidade (LTBI) tem sido utilizado, no sentido de adicionar efeito positivo no processo de reparo ósseo associado ou não a outros biomateriais, pois apresenta uma boa capacidade de penetrar em tecidos, graças a sua baixa densidade de energia e comprimento de onda, dessa forma estimulando a síntese de fatores de crescimento, aumento da atividade e proliferação celular, produção de colágeno e angiogênese (LI; LEU, 2005), além da ação anti-inflamatória e capacidade de acelerar a cicatrização. (PRETEL; LIZARELLI; RAMALHO, 2007; OLIVEIRA et al., 2012;).

Em estudos clínicos, a LTBI proporciona ao paciente submetido à intervenção cirúrgica uma cicatrização tecidual mais rápida, reparando os tecidos moles, ósseo e nervoso, reduzindo o edema e o desconforto no pós-operatório (TRELLE; MAYAYO, 1987), além de interferir na modulação e na atenuação da sintomatologia dolorosa. (FERNANDO et al., 1993).

Estudos mostram que a laserterapia de baixa intensidade usada em células como os osteoblastos para regeneração óssea apresenta resultados positivos (FUJIHARA; HIRAKI; MARQUES, 2006).

Além disso, também já foram testadas em outras células como fibroblastos, ceratinócitos, células endoteliais e miofibroblastos, exibindo bons resultados finais (KREISLER et al., 2003), estando essas células associadas ou não a arcabouços. (BARBOS et al., 2003; PRETEL; LIZARELLI; RAMALHO, 2007; GARCIA et al., 2013; MARQUES et al., 2015).

O desenvolvimento de processos e técnicas que auxiliem no reparo ósseo são importantes devido ao potencial terapêutico aplicado no tratamento de defeitos ósseos. Esses procedimentos muitas vezes requerem a ajuda de materiais “bioativos” que se integram com moléculas biológicas ou células e regeneram tecidos (STEVENS, 2008; AMIN et al, 2012), além do uso de novas técnicas que irão auxiliar nesse desenvolvimento ósseo, como a laserterapia.

Entretanto, ainda há poucos relatos do uso do laser de baixa intensidade combinado com arcabouços de colágeno para regeneração óssea guiada. Desta forma, foi investigada em um modelo animal a hipótese de que a aplicação do laser combinado com um arcabouço de colágeno trará resultados positivos no reparo ósseo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 REGENERAÇÃO ÓSSEA

O tecido ósseo serve de suporte para os tecidos moles e protege órgãos vitais, como cérebro, pulmão e coração. Além disso, os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato outros íons, mantendo-os em concentração controlada no nosso organismo. Sua composição é formada por aproximadamente 8% de água e 92% de material sólido, sendo esse último dividido em aproximadamente 21% de material orgânico e 71% de material inorgânico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Composto por uma matriz extracelular e células denominadas osteoblastos, que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea que, ao serem envolvidos pela matriz, dão origem aos osteócitos, células geralmente organizadas na superfície óssea, que se encontra em cavidades dentro da matriz, responsáveis pela nutrição da mesma.

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas e móveis, participam do processo de reabsorção do tecido ósseo, penetram na matriz através de ação enzimática, e junto aos osteoblastos participam da remodelação óssea (BURKITT et al., 1997).

O osso é recoberto, ainda, por uma camada de tecido conjuntivo frouxo, interna e externamente, que é conhecido como endóstio e perióstio, respectivamente. A camada mais superficial do perióstio contém fibras colágenas e fibroblastos, que o mantém firmemente preso ao osso.

Na camada mais interna do perióstio, encontram-se células osteoprogenitoras, semelhantes morfológicamente aos fibroblastos, elas se multiplicam por mitose e diferenciam-se em osteoblastos, o que é importante no crescimento e reparo ósseo. O endóstio é geralmente constituído por camada de células osteogênicas achatadas, que revestem internamente as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, os canais de Havers e os de Volkmann (BURKITT et al., 1997; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Sabe-se que o osso, como outros tecidos do nosso organismo, possui alta capacidade de regeneração e reparo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Porém, a sua reparação depende de alguns fatores clínicos como: extensão da perda óssea, localização, infecção e condições sistêmicas (SCHNEIDER; HELMS, 1998; SHAPIRO, 2008).

Geralmente a cicatrização perdura até a completa restauração da função e da anatomia óssea (CAPLAN, 1987).

Durante o processo de formação e remodelação óssea são encontrados três tipos de células: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. O processo de formação óssea ocorre em três fases: fase inflamatória, fase reparadora e fase de remodelação.

Na fase inflamatória, ocorre a formação de coágulo sanguíneo que envolve as superfícies ósseas no local da lesão, estendendo-se pelo perióstio e cavidades medulares próximas, acompanhadas de edemas mais ou menos intensos. Ocorrendo assim um processo inflamatório com mobilização de neutrófilos e macrófagos, com o objetivo de remover o coágulo nas regiões da lesão, e dos osteócitos mortos que aparecem no local.

Na fase reparadora, ocorre o aparecimento de inúmeros fibroblastos produtores de colágeno tipo III, responsáveis pela formação de um calo fibroso, no qual as fibras colágenas envolvem a lesão.

À medida que os macrófagos vão reabsorvendo o coágulo e o tecido ósseo necrosado surge, gradativamente, uma nova rede capilar, oriunda das células endoteliais dos vasos rompidos e das células mesenquimais indiferenciadas, que invadem a região do coágulo junto com os fibroblastos e osteoblastos, para formar rapidamente um novo tecido ósseo, pelo processo de ossificação intramembranosa ou endocondral, resultando em um osso imaturo.

Na fase remodeladora, o calo ósseo passa por uma série de processos de reabsorção e neoformação, até que a região lesionada retorne suas características morfológicas, biomecânicas e funcionais que possuíam antes da lesão. As atividades dos osteoblastos e osteoclastos removem o excesso de material do calo ósseo, restabelecendo as estruturas que havia antes. (HUBÁČEK; POSPÍŠILOVÁ; HLOŽEK, 1982; CATANZARO GUIMARÃES, 1982).

2.2 REMODELAÇÃO ÓSSEA

A ativação osteoclastogênica ocorre quando o hormônio da paratireóide (PTH) se liga a receptores nos osteoblastos induzindo a secreção de moléculas que iram recrutar os pré-osteoclastos para a superfície a ser reabsorvida. No local, os pré-

osteoclastos diferenciam-se em osteoclastos multinucleados ativos para reabsorção óssea (HADJIDAKIS; ANDROULASKIS, 2006).

Assim, os osteoblastos sofrem alterações em sua forma e expressa na superfície o RANKL, fator importante para diferenciação, sobrevivência e ativação dos pré-osteoblastos. O RANK, expresso pelas células pré-osteoclasticas, ativa uma cascata de sinalização que promove ativação dos osteoclastos (PACIFICI, 2010).

Por outro lado, OPG, expresso pelos osteoblastos, regula negativamente a formação e ativação dos osteoclastos ao interromper a ligação RANKL/RANK.

O OPG inibe a diferenciação final e ativação dos osteoclastos, induzindo a sua apoptose (SINGH, et al., 2012).

Os macrófagos e neutrófilos presentes no local da remodelação serão essenciais para secreção de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento como TGF- β , FGF, IGF, PDGF. Sob a influência do FGF, VEGF e angipoeina 1 e 2 ocorre a migração de células endoteliais e fibroblastos para o local da remodelação (LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002).

O VEGF é um dos fatores mais importantes para criação de novos vasos sanguíneos no tecido ósseo, favorecendo a angiogênese. Ocorre o recrutamento dos pré-osteoblastos, que são ativados por fatores de crescimento e produtos secretados pelos osteoclastos, se diferenciam em osteoblastos ativos (maduros), iniciando a produção da matriz orgânica, composta principalmente de colágeno tipo I, formando o osteóide. Posteriormente, com a incorporação da hidroxiapatita, ocorre a mineralização da matriz pelos osteoblastos, através da liberação de vesículas ricas em fosfatase alcalina (DALLAS; BONEWALD, 2010; ERIKSEN, 2010)

2.3 MODELO DE REPARO ÓSSEO

O defeito crítico é definido como o menor defeito ósseo que não será possível cicatrizar naturalmente durante a vida do animal. Estudos experimentais com o objetivo de avaliar o processo de regeneração devem apresentar características morfológicas de extensão e largura suficiente para impedir a regeneração óssea espontânea (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Em modelo animal de ratos, o defeito de tamanho crítico é considerado aquele igual ou maior do que 5mm. (SZPALSKI et al., 2010).

Ratos e camundongos são modelos bastante utilizados para experimentos, pois são fáceis de manusear e de baixo custo, podem ser usados em grandes quantidades, são alojados em locais pequenos não ocupando muito espaço. O uso de fatores/intervenções local ou sistemicamente, pode favorecer o uso mais econômico dos mesmos e uma triagem mais rápida do método para determinar os efeitos nas células ósseas (DUNSTAN; BOYCE, 1998).

Ainda, segundo Mooney e Siegel (2005), o uso desse modelo tem outras vantagens como: a padronização das condições do experimento; a genética específica ou ainda a facilidade de se obter mutantes; o curto tempo de vida; a rápida remodelação óssea; arquitetura óssea lamelar similar, presença de osso esponjoso e fragilidade semelhante ao humano; a ovariectomia de ratas imita o envelhecimento humano e a menopausa.

A calvária é formada por ossos intramembranosos, constituídos predominantemente por dois ossos parietais, direito e esquerdo, que se juntam ao longo de uma linha média da sutura sagital. Apresenta ainda um osso occipital na região frontal do crânio, e um osso lambdoide na região posterior. Essas estruturas dão referências para padronizar o local da intervenção. Além disso, o perióstio externo é coberto por pele frouxa sem ligação muscular, o que permite o fácil acesso ao local (MOONEY; SIEGEL, 2005).

Sendo assim, os ratos são modelos excelentes para testes iniciais que iram auxiliar na descoberta de novos métodos estudados pela engenharia de tecidos.

No estudo de Honma et al.(2008), foi avaliado o reparo natural de um defeito de tamanho crítico (8,8mm) e de tamanho não crítico (3,8mm) realizados em calvária de ratos. Utilizaram para aferir o reparo, análises radiográficas, histológica e hibridização in situ para expressão de colágeno tipo I e osteocalcina nos intervalos de 1, 2, 3, 4, 6, 12, 18, 24 e 36 semanas após a criação dos defeitos.

Observou-se que após 24 semanas, independente do tamanho do defeito, não havia mais reparo ósseo. Através da histologia, em defeito de tamanho crítico, após 2 e 3 semanas notou-se a formação óssea envolta da borda do defeito. O local de reparo foi preenchido por osteoblastos cubóides. Em 24 semanas não havia sido preenchido por completo por tecido ósseo, havia a presença de tecido conjuntivo fibroso. Na hibridização apresentou-se osteoblastos na superfície interna e externa do osso perto da borda ao redor do defeito e osteócitos na proximidade expressando colágeno tipo

I e osteocalcina intensificada em 2 e 3 semanas, porém não foi mais identificado no osso reparado em 24 semanas.

No estudo de Silva et al. (2007), avaliou-se histologicamente a resposta do tecido epitelial, conjuntivo e ósseo submetidos ao tratamento com laserterapia em um modelo em rato.

Foram testados dois comprimentos de onda diferentes 660nm e 780nm, e duas densidades de energia diferentes, 7,5J/cm² e 15J/cm², formando 4 grupos. Para a avaliação da regeneração óssea foram criados defeitos na mandíbula do animal e avaliados histologicamente 3, 7, 14 e 21 dias após o procedimento cirúrgico. Para o grupo controle, onde houve a regeneração óssea natural, aos 21 dias de reparo, observou-se a formação óssea cortical e medular. Já aos 28 dias observou-se a formação de um calo ósseo, compatível com a normalidade do osso original, indicando um tempo acessível para o reparo.

No estudo de Cunha et al.(2014), foi realizado um defeito de 5mm em calvária de ratos, esse defeito foi submetido a tratamento com osso autógeno e osso bovino, e a laserterapia, ambos separadamente e em conjunto. Análises histológicas foram realizadas 30 dias após a cirurgia. Para o grupo controle, ao final do tempo experimental, observou-se formação de tecido conjuntivo com fibras colágenas orientadas paralelas a superfície da ferida, uma pequena quantidade de osso neoformado ao longo da margem do defeito.

2.4 ESPONJAS DE COLÁGENO

Os polímeros naturais são muito estudados na produção de biomateriais destinados a engenharia de tecidos, dentre eles destaca-se o colágeno, devido a sua semelhança com a matriz extracelular. O colágeno apresenta biodegradabilidade, biocompatibilidade e algumas de suas principais funções como biomaterial são de proporcionar suporte mecânico, adesão e migração celular. Além disso, a esponja de colágeno é relatada para melhorar a formação óssea, promovendo a diferenciação dos osteoblastos. (SILVA, 2007; SUMITA et al, 2008; HONMA et al., 2008;)

O colágeno puro pode ser isolado da pele bovina, embebido em pH 3,0 e estabilizado em uma forma física de esponja (KHAN; KHAN, 2013). A esponja de colágeno tem a capacidade de facilmente absorver grande quantidade de exsudatos de tecidos, suavemente aderir ao leito do defeito úmido, preservando as condições e

também protegendo contra danos mecânicos e infecções bacterianas secundárias (CEN et al., 2008).

Os efeitos da esponja de colágeno sobre reparação tecidual são relatados há muito tempo na literatura. Esse biomaterial tem grande aceitação, pois apresenta características importantes como biocompatibilidade, rápida degradação fisiológica e adequada interação macromolecular e celular (FUJIMURA et. al.,1995; GEIGER; LI; FRIESS, 2003; FREIRE et al., 2011).

A esponja de colágeno no tecido ósseo tem capacidade osteocondutora e atua como suporte no crescimento e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, promovendo a formação e mineralização óssea, e na angiogênese, promovendo a formação de novos vasos sanguíneos. Sua atuação neste tecido é muito estudada, sendo associada a maior e mais rápida formação óssea nas áreas de defeito ósseo (SHIMOJI et al., 2009)

De acordo com Hsu (2013) quando comparou a esponja de colágeno absorvível, com cerâmica, com aloenxerto mineralizado e com fosfoerina rica em nanofibrina em gel, para avaliar a capacidade de adesão, proliferação celular, fator de crescimento e expressão osteogênica, observou que a fosfoerina teve os melhores resultados gerais. Porém, a esponja de colágeno absorvível apresentou o melhor resultado quando se avalia a maior sobrevivência e crescimento celular, adesão de pré-osteoblastos e a expressão das proteínas morfogenéticas ósseas (BMP-2).

Evidências também mostram que a esponja de colágeno quando combinada a algum fator, ou outro arcabouço, se mostra bastante eficiente, mais do que a esponja de colágeno isoladamente.

Segundo Shimoji et al. (2010),foi utilizado diferentes concentrações de FGF-2 combinadas a uma esponja de colágeno tratada em gel. Realizou-se um defeito craniano em ratos, dividiu em três grupos, o controle sem FGF-2 (F0), o com 3mg de FGF-2 (F3), e o com 15mg de FGF-2 (F15). O resultado 1, 2 e 5 semanas após a cirurgia mostrou-se positivo quando o defeito foi tratado com FGF-2 e esponja de colágeno em gel, principalmente no grupo F15, mostrando que a esponja quando combinada ao fator de crescimento realiza um efeito positivo no reparo ósseo.

Outro estudo que também usou a influência da FGF-2 combinado a esponja de colágeno foi o de Kigami et al. (2014), em que se avaliou através de tomografia microcomputadorizada e histologia o efeito na angiogênese e no reparo ósseo no

defeito em calvária de ratos. Esponja de colágeno com e sem FGF-2 (0,1% e 0,3%) foi implantada no defeito, e foram avaliados 7, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia.

Novos vasos sanguíneos começaram a aparecer nas bordas do defeito ósseo no 7º dia, e o volume de vaso sanguíneo aumentou até 28 dias em todos os grupos, porém maior no grupo do FGF-2 0,3% e esponja de colágeno. Na avaliação histológica apareceram mais vasos, osteoblastos e osteoclastos nos grupos com FGF-2, no período de 21 e 28 dias.

No trabalho realizado por Maraldi (2013), foi criado um defeito craniano em ratos e tratou com arcabouço de colágeno com e sem células-tronco. Foi avaliado 4 e 8 semanas após a cirurgia. Foi realizada uma avaliação histológica e imunofluorescência, e notou-se que a esponja de colágeno deu auxílio às células-tronco humanas implantadas no defeito, o que reforça a teoria de que a esponja de colágeno quando combinada a outro fator tem influência positiva no reparo ósseo.

O estudo de Riccio et al. (2010) traz a caracterização da diferenciação osteogênica *in vitro* das células-tronco da polpa dentária humana, quando cultivadas em uma esponja de colágeno e em Matrigel. Os resultados para as células cultivadas em esponja de colágeno foram positivos, houve a expressão de colágeno tipo I e de forma calcificada da matriz óssea contendo estruturas trabeculares.

Há, igualmente, estudos da interação da proteína morfogenética BMP-2 junto à esponja de colágeno, relatado sempre como um bom carreador dessa proteína.

Por exemplo, no estudo de Visser et al. (2009), modificou-se um decapeptídeo de ligação de colágeno adicional, e testou sua afinidade para o colágeno e sua capacidade de induzir formação óssea em defeitos cranianos de ratos, quando implantado em combinação com a esponja de colágeno e a hidroxiapatita.

Os resultados mostraram que a proteína BMP-2 tinha uma afinidade aumentada para o colágeno, e também que essa ligação era muito estável durante um período prolongado de tempo. Manteve sua atividade osteoindutora, sendo capazes de induzir a formação de osso novo, mesmo em baixas concentrações de rhBMP-2 nativo. Indicando a favorável combinação da BMP-2 com a esponja de colágeno.

No estudo de Kim et al.(2014), investigaram *in vitro* e *in vivo* a medida de rhBMP-2 necessária para dá início ao efeito de reabsorção óssea e tentaram inibir a sinalização desse efeito de reabsorção com o inibidor NFAT como molécula alvo.

Em altas doses de rhBMP-2 (20mg/defeito) ocorre a ativação do osteoclasto reforçada e a expressão dos marcadores de reabsorção óssea, quando comparados com baixas doses (5mg/defeito) após uma semana da cirurgia, juntamente com a esponja de colágeno. O que também foi observado na expressão de marcadores de formação óssea, em especial na expressão de RANKL, quando tinha uma baixa na expressão de OPG. Os melhores resultados foram observados no grupo tratado com NFAT e rhBMP-2 20mg e esponja de colágeno.

2.5 LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE

O laser é uma forma de radiação não ionizante, não invasiva, sendo altamente concentrada, e quando em contato com os tecidos resulta em efeito térmico, fotoquímico, dependendo do seu tipo. A palavra LASER é um acrônimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que significa amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (SULEWSKI, 2000).

O laser de baixa intensidade utiliza baixa densidade de energia e comprimento de onda, mas suficientes para desencadear nas células um processo de biomodulação, resultando em aumento da atividade, proliferação e regeneração celular, síntese de fatores de crescimento, produção de colágeno, angiogênese, além de analgesia e efeito anti-inflamatório. (LI; LEU, 2005).

A laserterapia pode ser de dois diferentes espectros, de acordo com seu comprimento de onda. O espectro de ação vermelho ou visível com comprimento de onda entra 630 a 700 nm, e o infravermelho ou invisível, com comprimento de onda entra 700-904 nm. O laser na faixa do visível atua principalmente nas mitocôndrias e lisossomos, induzindo diretamente à síntese de enzimas. Já o laser na faixa do invisível age nas membranas celulares através de alterações no potencial das mesmas, desencadeando efeitos fotofísicos e fotoelétricos, responsáveis pela excitação de elétrons, vibração e rotação de moléculas, que se traduzem no aumento da síntese intracelular de ATP. (LIZARELLI, 2010).

No trabalho de Siéssere et al. (2011) foi realizado um defeito craniano em ratos, e os grupos foram divididos em 7 com 7 animais cada. Grupo 1, uma única aplicação de laser. Grupo 2, com 7mg de rhBMP-2. Grupo 3, laser mais 7mg de rhBMP-2. Grupo 4, com 7mg de rhBMP-2 em monoleína em gel. Grupo 5, laser mais 7mg de rhBMP-2 em monoleína em gel. Grupo 6, laser e monoleína em gel. E grupo 7, o controle. Usou-

se uma incidência de laser no comprimento de onda de 780nm, dosagem de 120J/cm² e tempo de 80 segundos (60mW, e 1,5W/cm²). Os animais foram mortos em 15 dias após a cirurgia, e foram feitas análises histológicas e histomorfométrica.

Os resultados foram bastante favoráveis aos grupos 2 e 3. O grupo 3 mostrou histomorfometricamente maior área de formação óssea, o que indica que a junção do tratamento de laser de baixa intensidade com a rhBMP-2 foi de grande importância no reparo ósseo. Para o grupo 1, apenas a aplicação do laser, exibiu o tecido conjuntivo fibroso como uma extensão do periósteo com uma estrutura organizada e grossa, e um grande número de células na periferia da lesão óssea. O osso recém-formado mostrou cavidades medulares com bastante osteoblastos na periferia de trabéculas. Os osteócitos estavam em lacunas indicando imaturidade óssea.

Segundo Pretel et al.(2007), quando avaliou o reparo em mandíbula de 30 ratos separados em dois grupos, controle e laser, ele observou que o laser é bastante promissor no reparo. Utilizando o comprimento de onda de 780nm, dosagem de 178J/cm² e 40 segundo uma aplicação única (35mW, e 1,4J), os animais foram sacrificados 15,45 e 60 dias após a cirurgia. Os resultados mostraram que os grupos com laser tiveram abreviada reação inflamatória inicial e promoção rápida na formação de matriz óssea nova aos 15 e 45 dias, aos 60 dias não houve resultados significativos.

Para Cunha et al. (2014), comparou-se o efeito do laser no reparo ósseo em calvária de ratos quando combinados com osso autógeno e inorgânico de osso bovino. As características do laser 780nm, 100mW, 210J/cm², 60 segundos/ponto e 5 pontos. Os grupos foram Controle, Laser, Osso Autógeno, Osso Autógeno mais Laser, Osso Bovino e Osso Bovino mais Laser. Os animais foram sacrificados com 30 dias, e foram feitas análises histológicas e histomorfométricas. Os grupos irradiados com laser apresentaram maior área de formação de osso novo, mostrando que o laser acelerou a cicatrização e a reabsorção de partículas do enxerto. Para o grupo do laser, foram observadas formação de osso novo rodeada por uma matriz de osteóide, feixe de fibras colágenas, ausência de infiltrado inflamatório, formação de osso novo estendendo-se linearmente para o centro e áreas de osso remodelado observadas na região do osso velho.

Para o estudo de Vasconcellos et al.(2014), investigou-se a consolidação óssea no fêmur de ratos osteopênicos e normais, fez os seguintes tratamentos: Sham (simulação de ovariectomia), Laser mais Sham, Ovariectomia, Laser mais

Ovarectomia. Os animais foram sacrificados 2, 4 e 6 semanas após a cirurgia. O Laser utilizado tinha 780nm, 40mW, 1minuto e 40segundos, 4J/cm², 4 pontos e 7 aplicações. Houve melhora na osseointegração em processos osteopênicos e normais, melhor efeito na fase inicial (2 semanas) da aplicação.

Segundo Silva et al. (2007), quando comparou histologicamente o reparo de tecido epitelial, conjuntivo e ósseo mediante tratamento de laserterapia de baixa intensidade, em um modelo animal. Esses animais foram divididos em 4 grupos de acordo com as características do laser. O grupo 1 tem 10mW de potência única e 660nm – 7,5J/cm²; o grupo 2 tem 660nm – 15J/cm²; o grupo 3 tem 780nm – 7,5J/cm²; e o grupo 4 tem 780nm – 15J/cm². O tempo experimental foi de 3, 7, 14, 21 e 28 dias. Como resultado para tecido ósseo, os grupos com comprimento de onda no infravermelho (780nm) apresentaram melhores resultados na cicatrização. No grupo 3, aos 21 dias, observou-se osso medular formado, circundado por osso cortical, e aos 28 dias, deu-se formação óssea normal. Para o grupo 4, aos 21 dias notaram-se ilhas de osso compacto entremeadas por tecido conjuntivo, com áreas de processo inflamatório crônico, e aos 28 dias o tecido que circundou as ilhas ósseas apresentou-se moderadamente compacto, porém não as envolveu como um todo.

No trabalho de Morrone et al. (2000), foi utilizada a terapia de laser em defeitos osteocondrais em coelhos, diâmetro de 2,5mm e profundidade de 2mm no côndilo femoral radial. O joelho esquerdo de cada animal foi tratado com laser intra-operatório de 780nm, 30J/cm², 1W, 30Hz, 10minutos. O joelho direito foi tratado como controle. Os animais foram mortos 2, 6 e 12 semanas após a cirurgia e o material foi analisado histomorfometricamente.

Os resultados com o laser mostraram uma cura mais rápida do defeito, melhoria da morfologia celular e aspecto regular do tecido. Um estudo semelhante foi realizado por Guzzardella et al. (2011), também tratando defeitos no côndilo de coelhos, os defeitos tratados com as mesmas características do laser de Morrone.

Os animais foram mortos 24 semanas após a cirurgia, e foram avaliados histomorfometricamente. O resultado mostrou aspectos do tecido osteocondral reparados e morfologia celular regular.

Segundo Soares et al. (2014), defeitos no fêmur de 40 ratos tratados com a laserterapia (780nm, 70nW, 120J/cm² - sessão), e biomaterial de hidroxiapatita. Os animais foram divididos em 4 grupos, o controle, o laser, o biomaterial e o biomaterial com laser. As aplicações de laser foram feitas em 4 pontos no intervalo de 48 horas

repetidas por 2 semanas. Os animais foram sacrificados 15 e 30 dias após a cirurgia e foram feitas análises histológicas. O grupo de laser com biomaterial mostrou melhores resultados maior reabsorção óssea, neoformação, infiltrado inflamatório, e presença de colágeno. No grupo só com tratamento de laser apresentou defeito completamente preenchido por osso recém-formado e trabéculas ósseas junto com a presença de osteóide, além de intensa inflamação crônica, sinais de reabsorção e presença de colágeno maduro.

Houve ainda trabalho onde o efeito do laser não foi significativo, com foi o caso de Lyomasa(2012), em que se avaliou o efeito do laser combinado com a proteína morfogenética, com a monoleína e com uma proteína extraída da árvore *Hevea brasiliensis*(P-1). Ele dividiu os animais em dois grandes grupos, o com laser e o sem laser, e esses grupos em 5 subgrupos, o 1º 5mg de rhBMP-2, o 2º 5mg de P-1, o 3º 5mg de rhBMP-2 mais Monoleína em gel, o 4º 5mg de P-1 mais monoleína em gel, e o 5º só a monoleína em gel. O laser tinha 780nm, 60mW e 30J/cm². Não mostro diferença significativa entre os dois grandes grupos de com e sem laser.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do laserterapia combinados com arcabouço de esponja de colágeno na cicatrização de um defeito crítico na calvária de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o reparo ósseo radiograficamente.
- Avaliar através da análise histológica se houve formação de osso novo no local do defeito, e outras características que indiquem que o tecido está em reparo.
- Avaliar através da análise imunohistoquímica a expressão dos fatores de crescimento envolvidos na regeneração do tecido ósseo.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

O presente estudo é um estudo experimental controlado, prospectivo e *in vivo*.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), número do protocolo 067/2014 (3). Foram utilizados 45 ratos Wistar machos adultos (de aproximadamente 6 meses), pesando em média 320gramas. Foram divididos em 4 grupos (**Tabela 1**), cada um com 10 animais, onde em cada grupo será criado um defeitos cranianos simétricos de 5mm. Os grupos que receberam a incidência de laser diodo (Kondortech – BioWave LLLT Dual,Brazil) na dosagem de 120J/cm² (potência de 50 mW, tempo de exposição de 10 s) e comprimento de onda de 780nm, com aplicações feitas em 4 pontos equidistantes em torno do defeito com distância de 1mm da borda, logo após o procedimento cirúrgico, 48horas e 96horas depois, protocolo adaptado do artigo de Marques et al.,(2015). A esponja de colágeno utilizada era da marca Hemospon® (Tecnew, 10 Und.), ela foi cortada com uma lâmina de bisturi no tamanho aproximado do defeito, com espessura de aproximadamente 1mm.

Tabela 1 – Grupos do experimento. Natal/RN, 2015.

Grupos	Definição	21 dias	30 dias
G0	Controle Positivo (com defeito)	5 animais	5 animais
G1	Esponja de Colágeno (Hemospon®)	5 animais	5 animais
G2	Laserterapia	5 animais	5 animais
G3	Esponja de Colágeno + Laserterapia	5 animais	5 animais

Fonte: Autora (2015).

4.3 CRIAÇÃO DO DEFEITO CRÍTICO

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina (10%), na dosagem de 80mg/kg, e Xilazina (2%) na dosagem de 10mg/kg. Uma incisão na pele feita a partir da área do nariz frontal na protuberância do osso occipital externo, expondo a extensão da calvária (**Figura 1**). Um defeito craniano simétrico de espessura total de 5 mm foi feito entre as duas regiões parietais, no centro do crânio, com uma broca de trefina acionada por um micromotor elétrico de 30.000 rpm (NSK®), sob irrigação constante de solução fisiológica estéril para evitar superaquecimento do osso (SOARES et al., 2014).

Foram implantados os arca-bouços nos grupos experimentais (G1 e G3) (**Figura 2**), e um grupo recebeu a incidência do laser (G3), enquanto o outro não (G1). A

primeira incidência foi logo após o procedimento cirúrgico, e foram feitas irradiações a cada 48 horas por 2 dias, adaptado do artigo de Marques et al. (2014).

Já o Grupo G2 recebeu apenas a incidência do laser. Para cuidado pós-operatório foi utilizado analgésico Dipirona monoidratada 500mg, uma gota via oral (gavagem) durante 5 dias, e 5 gotas no bebedouro por 1 semana.

Figura 1 – Defeito crítico de 5mm em calvária de rato. Natal/RN, 2015.



Fonte: Autora (2015).

Figura 2 – Defeito preenchido com esponja de colágeno. Natal/RN, 2015.



Fonte: Autora (2015).

4.4 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

As análises radiográficas foram feitas na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, no departamento de Odontologia (Raio xTimex 70c parede gelo 220v +4% - 60Hz). Foram levados os exemplares dos crânios dos animais e o raio x teve 0,32 tempo de exposição, as peças estavam a 40cm do equipamento. Para revelação utilizou-se 90 segundos no revelador, 30 segundos na água e 3 minutos no fixador.

As radiográficas foram escaneadas, não sofreram nenhum processo de modificação da imagem, foram avaliadas através de um programa de imagem, o ImageTolls, e dado os escores através da análise de um examinador, baseando-se na tabela abaixo (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Escore de Raio X. Natal/RN, 2015.

Escore	Definição
0	O defeito apresenta 0 a 25% de sua área total com imagem radiopaca visível, compatível com tecido ósseo mineralizado
1	O defeito apresenta 25,1 a 50% de sua área total com imagem radiopaca visível, compatível com tecido ósseo mineralizado
2	O defeito apresenta 50,1 a 75% de sua área total com imagem radiopaca visível, compatível com tecido ósseo mineralizado;
3	O defeito apresenta 75,1 a 100% de sua área total com imagem radiopaca visível, compatível com tecido ósseo mineralizado.

Fonte: Nagata (2011).

4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a histologia, os exemplares cranianos foram fixados em formol 10%. Foi feita a descalcificação com ácido nítrico 5% durante 10 dias. Em seguida foi feita a desidratação com 3 banhos de álcool (80%, 90% e 100%), por 1 hora cada, seguidos de 3 banhos de xilol, 1 hora cada, e por último 3 banhos de parafina, seguida de “emblocamento” das peças e identificação. Após os blocos corretamente identificados foram realizados cortes de 5µm no micrômetro, e esses cortes fixados em lâmina e coradas por hematoxilina e eosina (**RICCIO et. al., 2010; ANNIBALI et al., 2013; ARAÚJO et al., 2014**).

Foram avaliados, por um examinador experiente, os seguintes eventos histomorfológicos: (a) Grau de inflamação; (b) Formação e qualidade do tecido ósseo formado; (c) e grau de maturação de colágeno (**Tabela 3**). (PRETEL et al., 2007)

Tabela 3 – Pontuações atribuídas aos diferentes eventos histológicos. Natal/RN, 2015.

Escore	(a) Grau de inflamação
1	Ausência de células inflamatórias
2	Moderada presença de células inflamatórias
3	Intensa presença de células inflamatórias
Escore	(b) Formação e qualidade do tecido ósseo formado
1	Formação de tecido novo (preenchimento do defeito com tecido conjuntivo, que contém capilares sanguíneos, fibroblastos, Macrófagos e fibras colágenas recém-formadas)
2	Tecido conjuntivo denso, sugerindo a diferenciação do tecido ósseo com a presença de um grande número de células e Organização de fibras
3	Formação de osso novo em que o tecido conjuntivo é diferenciando para formar ou indicar uma matriz óssea
4	Presença de tecido ósseo
Escore	(c) Grau de maturação do colágeno
1	Nenhuma evidência de união óssea, enchimento da ferida cirúrgica com tecido conjuntivo — isotropia (ausência de birrefringência)
2	Indica (formação de tecido conjuntivo no osso com células osteogênicas e osteoprogenitoras) — baixa anisotropia
3	Espículas de osso imaturo isoladas — anisotropia moderada
4	Compacta formação óssea — anisotropia intensa (polarização total)

Fonte: Pretel et.al. (2007).

4.6 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Para análise imunohistoquímica foram utilizados 4 marcadores, para as melhores lâminas dentre os grupos nos dois tempos (21 e 30 dias). Os marcadores utilizados foram, RANK/OPG na diluição de 1:400, que são marcadores de osteoblasto e osteoclasto que sinaliza o processo de formação óssea. Além desses, também foram usados FGF-2/TGF-Beta na diluição de 1:500, que são fatores de crescimento envolvidos com a formação de matriz orgânica.(ARAÚJO et al., 2014)

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

4.7.1 Raio X

Os raios X foram avaliados utilizando um programa de imagens o ImageTolls, onde foi mensurada a área de reparo do defeito crítico em cada grupo. Em seguida foi feita uma regra de 3, para descobrir a porcentagem de cada área reconstruída e dado seus escores. Então esses escores foram avaliados no GraphPadPrims 6, utilizando testes de média, mediana e qui-quadrado.

4.7.2 Histologia

As lâminas foram postas em microscópio e analisadas por um avaliador que atribuiu os escores a cada lâmina de cada grupo. Esses escores foram somados e avaliados via GraphPadPrism6, através do teste Kruskal-Wallis e Dunn.

4.7.3 Imunohistoquímica

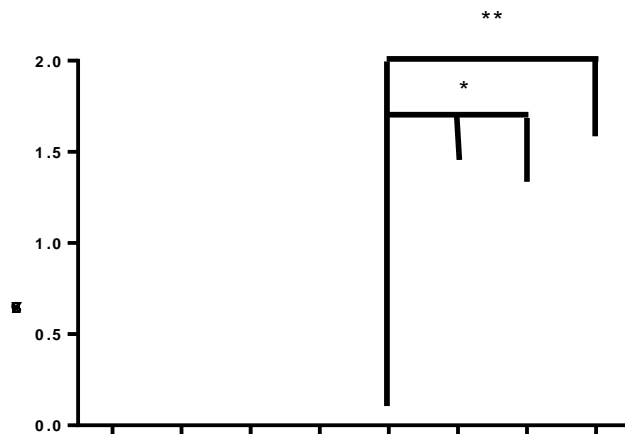
Essas lâminas foram avaliadas por um examinador que deu características qualitativas e quantitativas para cada uma. Análise estatística foi realizada através do GraphPadPrism6, utilizando o teste Kruskall Wallis.

5 RESULTADOS

5.1 RADIOGRAFIAS

Observou-se que não houve diferença estatística entre todos os grupos de 21 dias. Porém grupos tratados (G1, G2 e G3) de 30 dias mostraram-se significativamente diferentes quando comparados ao grupo controle (G0) de 30 dias. Sendo o grupo G3 de maior destaque estatístico com $p < 0,01$ (**Gráfico 1**).

Gráfico 1 – Representa o reparo ósseo dos grupos através da análise radiográfica. Natal/RN, 2015



Fonte: Autora (2015).

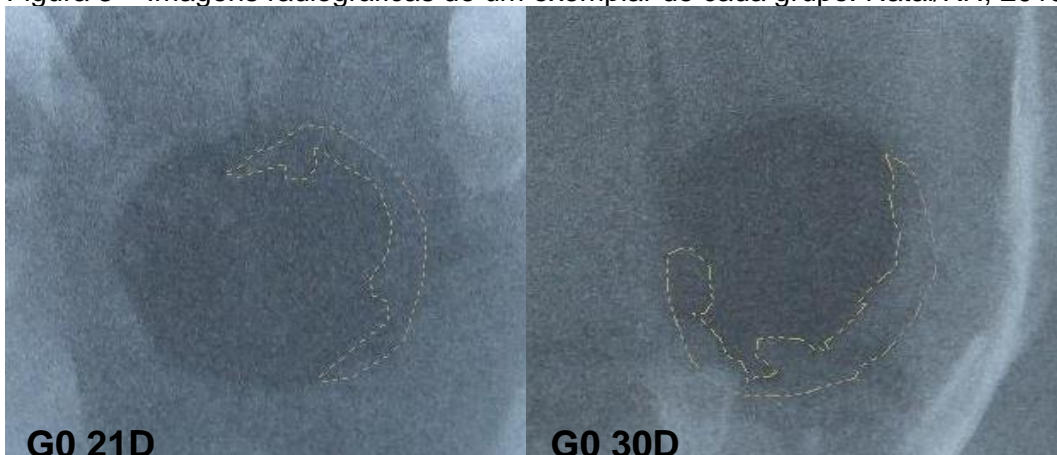
* $p < 0,05$

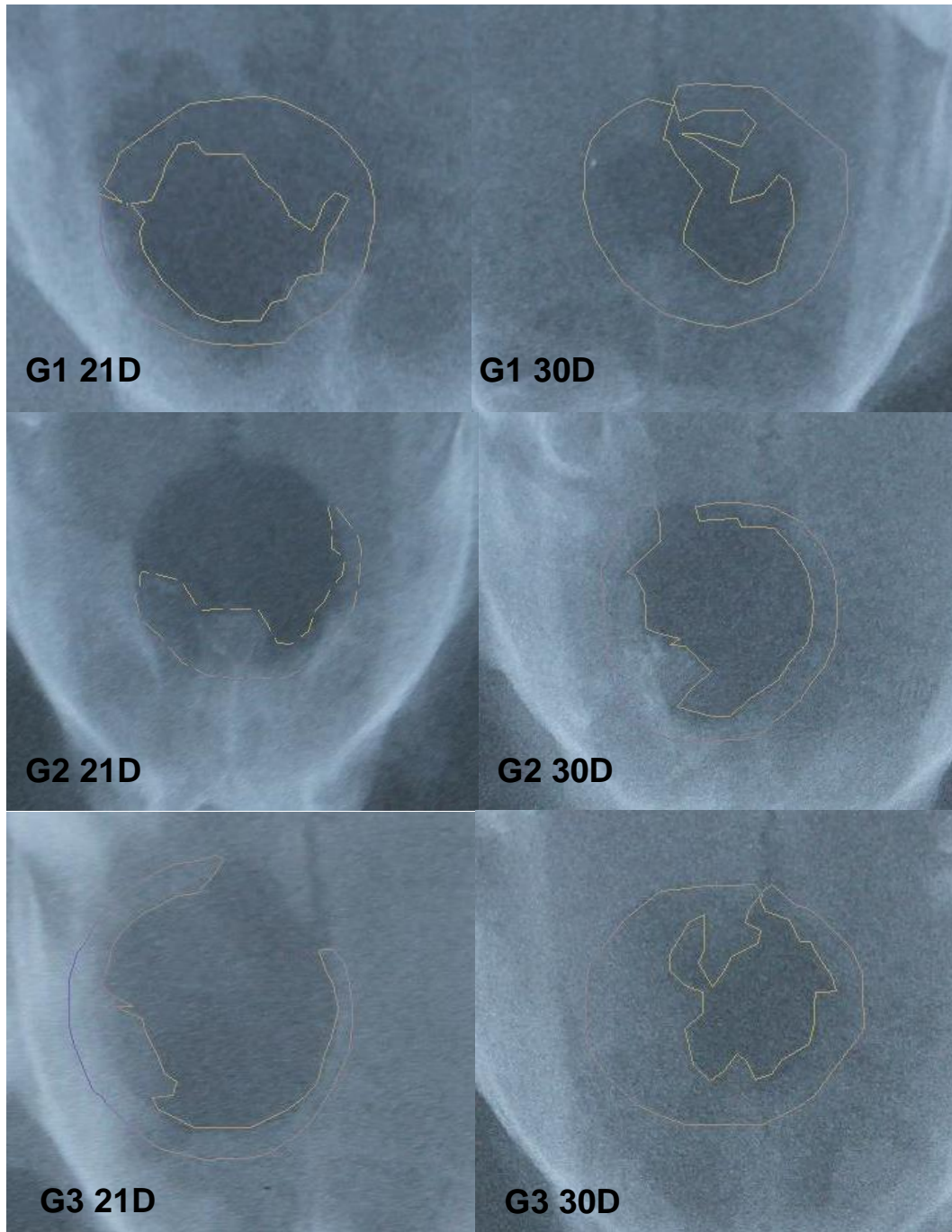
** $p < 0,01$

Não mostra diferença significativa entre os grupos de 21 dias, apenas entre os grupos tratados (G1, G2, G3) de 30 dias quando comparados ao seu respectivo controle (G0). **G0 21D** = Controle 21 dias; **G1 21D** = esponja de colágeno 21 dias; **G2 21D** = laserterapia 21 dias; **G3 21D** = Esponja de colágeno mais laserterapia 21 dias; **G0 30D** = Controle 30 dias; **G1 30D** = Esponja de colágeno 30 dias; **G2 30D** = Laserterapia 30 dias; **G3 30D** = Esponja de colágeno mais laserterapia 30 dias

Todavia não houve diferença significativa quando comparamos os grupos tratados de 30 dias entre si. Para os grupos de 21 dias, o G3 apresentou em média 27,91% de reparo, o G1 19,25% e o G2 12,79%. Já para os grupos de 30 dias, o G3 apresentou em média 55,16% de reparo ósseo, enquanto que o G1 39,14% e o G2 35,32%.

Figura 3 – Imagens radiográficas de um exemplar de cada grupo. Natal/RN, 2015.





Fonte: Autora (2015).

Legenda: **G0 21 D** = Controle de 21 dias; **G0 30D** = Controle de 30 dias; **G1 21D** = Esponja de colágeno de 21 dias; **G1 30D** = Esponja de colágeno de 30 dias; **G2 21D** = Laser de 21 dias; **G2 30D** = Laser de 30 dias; **G3 21D** = Esponja de colágeno + Laser de 21 dias; **G3 30D** = Esponja de colágeno + Laser de 30 dias.

Tabela 4 - Porcentagens de reparo

Grupos	Porcentagem de reparo
G0 21 Dias	6,53%
G0 30 Dias	7,42%

G1 21 Dias	19,25%
G1 30 Dias	39,14%
G2 21 Dias	12,79%
G2 30 Dias	35,32%
G3 21 Dias	27,91%
G3 30 Dias	55,16%

Fonte: Autora (2015).

5.2 ANÁLISE HISTOLOGICA

Os resultados das lâminas histológicas apresentaram-se favoráveis para os grupos de colágeno e laser (G3) de 30 dias quando comparados ao grupo controle (G0) de 30 dias (**Gráficos 2 e 3**). Como mostra na Figura 4, podemos observar a presença de osso secundário, osso imaturo (osteóide) e tecido conjuntivo neoformado (periósteo) em quase todos os grupos, menos nos grupos de Laser (G2) 21dias e Laser e colágeno (G3) 21dias que não apresentaram a formação de osso imaturo (**Figura 4**).

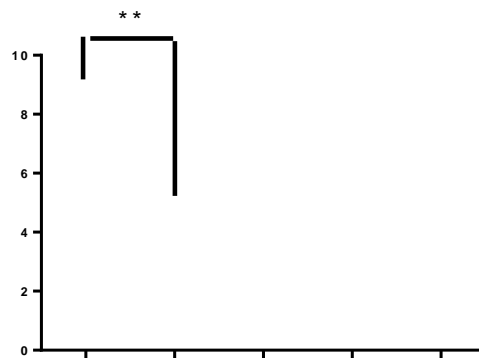
Aos 21 dias, o grupo controle positivo (G0) apresentou a intensa presença de células inflamatórias, formação de tecido novo através do preenchimento do defeito com tecido conjuntivo contendo capilares sanguíneos, fibroblastos, macrófagos e fibras colágenas recém-formadas, e nenhuma evidência de união óssea. Aos 30 dias, o mesmo grupo apresentou quase as mesmas características presentes aos 21 dias, diminuindo a presença de células inflamatórias e mostrando um tecido um pouco mais organizado, uma matriz óssea em mineralização.

Aos 21 dias o grupo esponja de colágeno (G1) apresentou moderada presença de células inflamatórias, tecido conjuntivo denso, sugerindo a diferenciação do tecido ósseo com a presença de um grande número de células e organização de fibras, além da presença de células osteogênicas e osteoprogenitoras. Aos 30 dias apareceu a formação de osso novo compacto em que o tecido conjuntivo é diferenciando para formar ou indicar uma matriz óssea.

Aos 21 dias o grupo Laser (G2) apresenta intensa presença de células inflamatórias, tecido conjuntivo denso, sugerindo a diferenciação do tecido ósseo com a presença de um grande número de células e organização de fibras, e presença de células osteogênica e osteoprogenitoras. Aos 30 dias apareceu a formação de osso novo compacto em que o tecido conjuntivo é diferenciando para formar ou indicar uma matriz óssea.

Aos 21 dias o grupo esponja de colágeno mais laser (G3) apresenta moderada presença de células inflamatórias, tecido conjuntivo denso, sugerindo a diferenciação do tecido ósseo com a presença de um grande número de células e organização de fibras, e presença de células osteogênica e osteoprogenitoras.

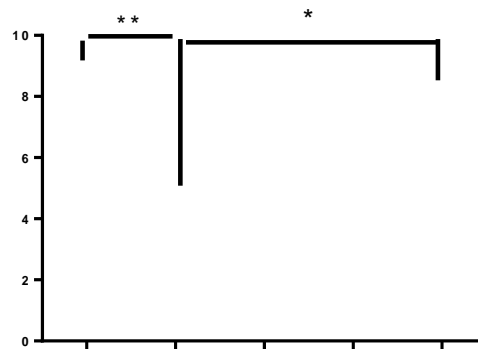
Aos 30 dias surgiu a formação de osso novo compacto, em que o tecido conjuntivo é diferenciando para formar ou indicar uma matriz óssea e em algumas lâminas apresentou ainda espículas de osso imaturo isoladas.



Fonte: Autora(2015).

**Houve diferença significativa entre o grupo controle negativo (C) e o grupo controle positivo (G0).

Gráfico 3 – Representa o reparo ósseo dos grupos de 21 dias através das análises histológicas. Natal/RN, 2015.

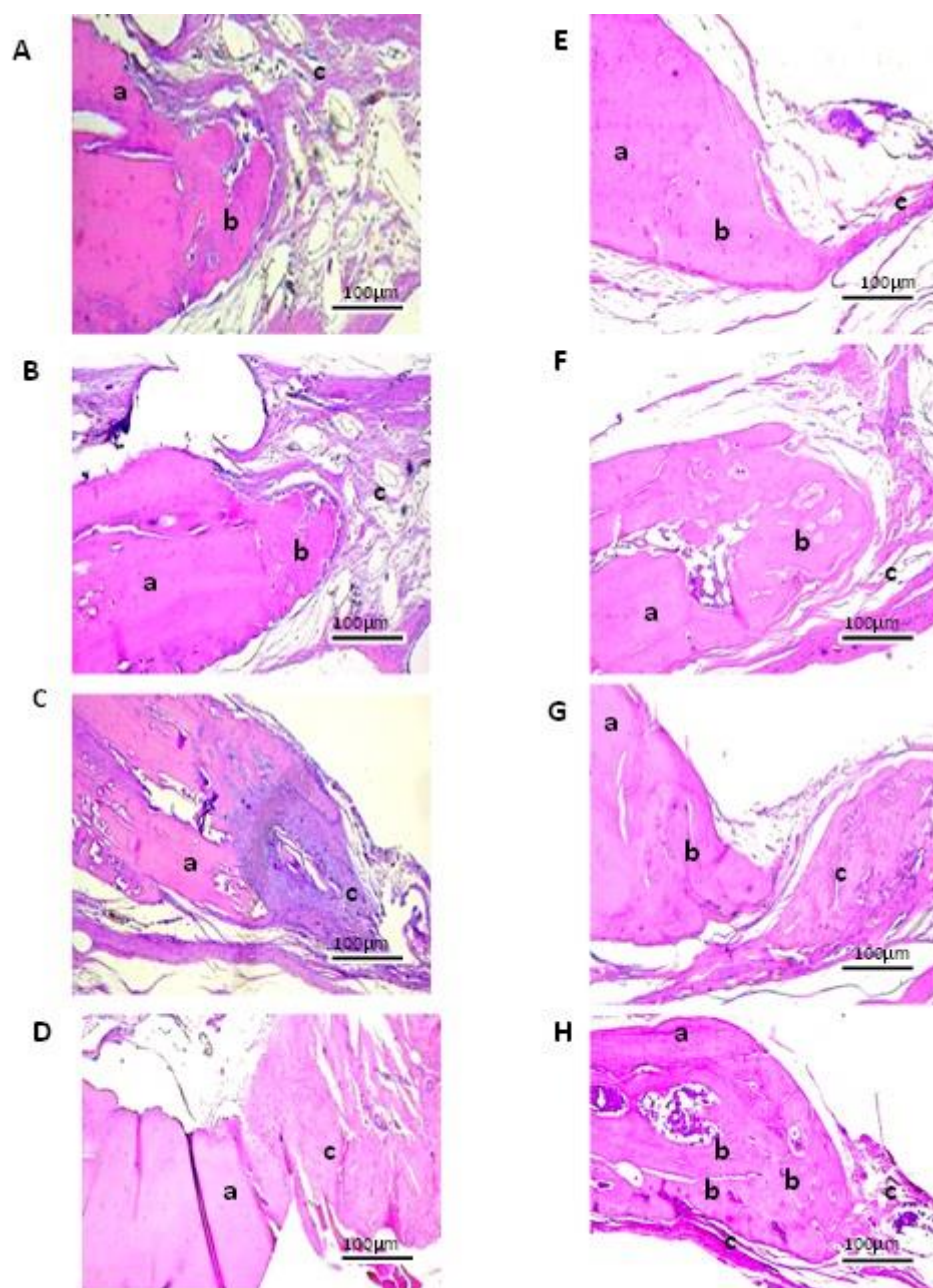


Fonte: Autora (2015).

*Houve diferença entre o controle positivo (G0) e o grupo de colágeno mais laser (G3).

**Houve diferença entre o grupo controle negativo (C) e o grupo controle positivo (G0).

Figura 4 – Imagem das lâminas histológicas de um exemplar de cada grupo. Natal/RN, 2015.



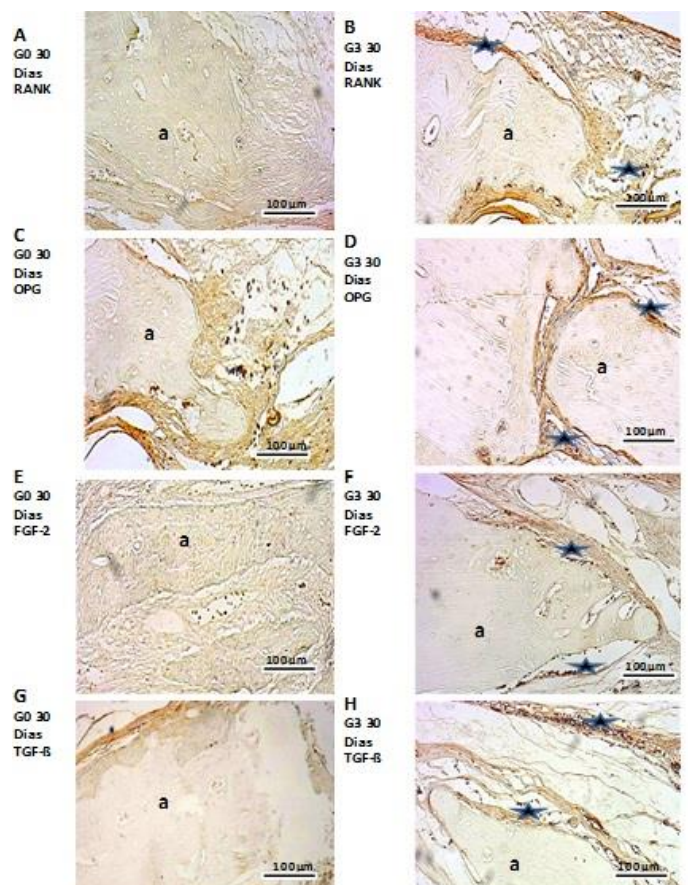
Fonte: Autora (2015).

Legenda: **A** = G0 21dias; **B** = G1 21dias; **C** = G2 21dias; **D** = G3 21dias; **E** = G0 30dias; **F** = G1 30dias; **G** = G2 30dias; **H** = G3 30dias. **a**: osso secundário; **b**: osso imaturo (osteóide); **c**: tecido conjuntivo neoformado (periósteo).

5.4 IMUNOHISTOQUÍMICA

Na imunohistoquímica podemos evidenciar osteoblastos na periferia do tecido ósseo original, além de estar presente ainda no tecido conjuntivo, indicando também células osteoprogenitoras, isso para os dois grupos e marcadores (RANK, OPG, FGF e TGF), mas principalmente para o grupo esponja colágeno mais laser (G3), o que indica atividade de remodelação óssea constante no tecido lesionado no tempo de 30 dias. E o OPG teve um aumento significativo no grupo colágeno mais laser (G3) de 30 dias (**Figura 5**). Além disso, o grupo G3 apresentou marcações muito fortes para todos os seus marcadores.

Figura 5 – Imagem das lâminas imunohistoquímicas de um exemplar de cada grupo. Natal/RN, 2015.



Fonte: Autora (2015).

Legenda: a: presença de osso. As estrelas indicam a marcação mais forte

6 DISCUSSÃO

O processo de reparo ósseo vem sendo abordado na bioengenharia no intuito de obter melhores resultados para o paciente. O uso de biomateriais tem se mostrado bastante eficiente nesse processo, além disso, a terapia de laser de baixa intensidade também é um forte indicador positivo na regeneração do tecido ósseo.

Dessa forma, o presente trabalho trouxe bons resultados para todos os grupos tratados. Na avaliação radiográfica os grupos G1, G2 e G3 de 30 dias mostraram-se favoráveis quando comparados ao grupo controle (G0), porém não foram estatisticamente significativos quando comparados entre si. Mesmo assim, o grupo G3 apresentou uma média de 55,16% de reparo ósseo, enquanto que o G1 apresentou 39,14% e o G2 35,32%. Ou seja, o grupo da esponja de colágeno junto a laser terapia apresentou maiores áreas radiopacas do que os demais grupos, indicando uma possível formação de uma matriz mineralizada e possível formação óssea. De maneira que, radiograficamente, a combinação das duas técnicas com 30 dias de reparo seria o melhor tratamento para regeneração do defeito de tamanho crítico na calvária dos ratos.

Aos 21 dias, radiograficamente, não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle, e nem entre os grupos tratados quando comparados entre si. O G1 apresentou cerca de 19,25% de reparo ósseo, o G2 cerca de 12,79% e o G3 27,91%. Diante disso, o G3 ainda com 21 dias se apresenta com bons resultados, sendo uma boa saída para uma recuperação possivelmente mais rápida.

Segundo Pinheiro (1992), as vantagens da laserterapia no processo de regeneração tecidual são muitas, como a diminuição da dor, estimulação da cicatrização, redução da inflamação, aumento na produção de fibroblastos e colágeno além do aumento na circulação sanguínea. Também, segundo Fujihara et al. (1995), a esponja de colágeno apresenta características importantes como biocompatibilidade, rápida degradação fisiológica e adequada interação macromolecular e celular, o que indica que sua interação com o tecido ósseo durante o reparo teve efeitos positivos, já que o colágeno é a base da matriz orgânica com cerca de 95% de sua composição constituídas por colágeno do tipo I (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Dessa forma, o grupo tratado com essas duas técnicas (G3) possivelmente é o mais indicado para o reparo, tanto no tempo de 21

dias como de 30 dias (LI; LEU, 2005; SUMITA, 2008; HONMA et al., 2008; SILVA et al., 2007; GOMES et al., 2007).

A esponja de colágeno é um arcabouço importante, não somente para sustentação celular, como também ele auxilia na diferenciação dos osteoblastos e facilita a migração e adesão dessas células no local da lesão. Juntamente a isso, foi adicionado o laser de baixa intensidade como um fator a mais para favorecer o reparo ósseo. Dessa forma o laser se faz importante pois acelera a diferenciação dessas células, e das células mesenquimais em osteoblastos, possivelmente diminuindo o tempo necessário para um melhor reparo do tecido ósseo.

Histologicamente, podemos perceber que o grupo G3 de 30 dias apresentou resultados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle (G0), o que confirma melhores resultados para terapia do laser com a esponja de colágeno.

Observa-se que no grupo controle há ainda a presença de células inflamatórias e o tecido mostra-se um pouco mais organizado com a presença de uma matriz imatura. Já no G3 observa-se o aparecimento de osso novo compacto em que o tecido conjuntivo é diferenciando para formar ou indicar uma matriz óssea e em algumas lâminas apresentou ainda espículas de osso imaturo isoladas. O que confirma o achado radiográfico onde encontra-se mais áreas radiopacas do que os demais grupos.

Tanto o laser como a esponja de colágeno aumentam a produção de colágeno no tecido lesionado, explicando dessa forma o aparecimento de uma matriz óssea imatura em abundância no grupo G3 de 30 dias, onde é encontrado principalmente colágeno como componente, marcando assim o osteóide nas lâminas histológicas.

Podemos comparar esse achado histológico com o trabalho de Soares et al. (2014), quando foi avaliado o reparo ósseo em fêmur de ratos com a utilização da técnica de laserterapia e biomaterial, observou-se esse grupo tratado com a laserterapia (780nm, 70mW, 140J/cm² total do tratamento, aplicados em 4 pontos) e hidroxiapatita+beta-tricalciofosfato, em 30 dias de reparo, notou-se o defeito preenchido por trabéculas ósseas de espessura variável, mostrando osteócitos, infiltrado inflamatório variando de ausente a moderada e presença de osteoblastos.

O grupo G1 aos 21 dias, quando comparado ao G2 de 21 apresenta maiores áreas radiopacas ao analisar os raio x, o que pode indicar um provável reparo ósseo mais bem sucedido. Porém ao ver histologicamente, os grupos se assemelham, diferenciando apenas os escores de algumas lâminas.

No grupo G1, por exemplo, quando avaliado a formação e qualidade de tecido ósseo formado (b), observamos tecido conjuntivo denso, sugerindo a diferenciação do tecido ósseo com a presença de um grande número de células e organização de fibras, escore 2.

Enquanto que no grupo G2 para a mesma avaliação (b) apareceu formação de osso novo em que o tecido conjuntivo é diferenciando para formar ou indicar uma matriz óssea, escore 3. Dessa forma, aparentemente o tecido conjuntivo denso e o biomaterial utilizado para reechar o defeito, presentes no G1 mostram-se nas áreas radiopacas do raio x, enquanto que no G2 observa-se o início da formação da matriz óssea, onde o tecido conjuntivo (que antes era denso) começa a se diferenciar, de maneira que essa matriz ainda não é mineralizada e sim orgânica, composta principalmente por fibras colágenas. Isso supostamente poderia explicar a diferença dos resultados do raio x e da histologia para os grupos G1 e G2 de 21 dias.

De acordo com Shimoji et al.(2009), ao utilizar uma esponja de colágeno composta por colágeno fibrilar e colágeno desidratado pelo calor, para um reparo de um defeito no fêmur de ratos, e avaliar histologicamente esse reparo em 3, 5, 10, 14 e 28 dias, observou-se que em 28 dias de reparo tratado houve o aparecimento de osso novo contínuo ao osso original e a presença de células na esponja. O que mostrou-se semelhante ao presente trabalho em 30 dias para o grupo G1 com a presença de osso imaturo contínuo ao osso original, com formação de espículas.

Em estudo de Berenguel (2006), em que se comparou o efeito da esponja de colágeno de duas marcas diferentes (Gelfoan® e Hemospon®) no reparo de uma exodontia realizada em ratos. A avaliação histológica foi realizada 5, 7, 15 e 24 dias após a cirurgia, mostrou que a esponja Hemospon® apresentou melhores resultados no reparo do que a Gelfoan®.

Aos 24 dias de reparo notaram-se estruturas trabeculares ósseas espessas, áreas com tecido conjuntivo rico em fibroblastos, além de espaços com coágulo sanguíneo. Dessa forma quando comparamos ao presente trabalho, o grupo G1 de 21 dias apresentou resultados semelhantes aos de Berenguel (2006), com formação tecido conjuntivo denso, formação discreta de tecido ósseo e infiltrado inflamatório moderado.

Os grupos G2 e G3 de 21 dias apresentam formação de matriz óssea imatura (osteóide) de discreta á ausente, e tecido conjuntivo neoformado. Segundo Kert e Christensen(1989) e Lyons et al.(1987), a terapia de laser de baixa intensidade

promove o crescimento celular, revascularização, cicatrização e redução da inflamação. O mecanismo que acelera a cicatrização é graças ao estímulo no metabolismo intracelular e na produção do colágeno pelos fibroblastos preexistentes no periósteo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Dessa forma, aos 30 dias de reparo esses grupos apresentaram bastante osteóide, e nota-se em algumas áreas um tecido ósseo mais organizado, o que pode nos indicar a atividade constante desse tecido para o reparo eficaz.

No trabalho de Soares et al.(2014), ao observar apenas os resultados do grupo tratado com a laserterapia (780nm, 70mW, 140J/cm² total do tratamento, aplicados em 4 pontos) em 30 dias de reparo notou-se a presença de osso recém formado, presença de colágeno, inflamação, e presença de osteócito. Esses achados corroboram com os achados histológicos do presente trabalho, onde observou-se a formação de osso novo compacto, tecido conjuntivo diferenciando para iniciar a formação de uma matriz óssea (presença de colágeno), e em algumas lâminas apresentou ainda espículas de osso imaturo isoladas.

O grupo G2 de 21 dias apresentou tecido conjuntivo neoformado e intenso infiltrado inflamatório, tecido conjuntivo denso sugerindo diferenciação em tecido ósseo com a presença de grande número de células e organização de fibras, e ainda a presença de células osteogênicas e osteoprogenitoras, o que confirma que o uso de laser nas fases iniciais ajuda na reconstrução (Vasconcellos e Barbara, 2014), além de aumentar a produção celular, a produção de fibroblastos, e ajudar na ação antiinflamatória (LI; LEU, 2005).

Segundo Silva, Gomes e Ulbrich (2007), em seu estudo para avaliar o efeito da laserterapia no tecido epitelial, conjuntivo e ósseo, ele utilizou 20 ratos, divididos em 4 grupos. Os grupos 1 e 2 receberam comprimento de onda de 660nm com densidade de 7,5J/cm² e 15J/cm², respectivamente. Os grupos 3 e 4 receberam 780nm com densidade de 7,5J/cm² e 15J/cm², respectivamente. Os animais foram sacrificados em 3, 7, 14, 21 e 28 dias. Na avaliação histológica para osso observou-se que no grupo 4 (780nm, 15J/cm², são parâmetros semelhantes ao presente trabalho) de 21 dia ocorreu a presença de ilhas de osso compacto entremeadas por tecido conjuntivo, com áreas de processo inflamatório crônico.

Para as análises imunohistoquímicas, utilizou-se apenas os grupos que se mostraram significativos na análise histológica, dessa forma, o grupo G3 de 30 dias quando comparado ao G0 30 dias apresentou marcações mais fortes para todos os

marcadores. Essa marcação forte para RANK, OPG, FGF-2, TGF- β , indica a atividade contínua de células fibroblásticas, osteoprogenitoras e osteoblásticas no tecido conjuntivo e osso neoformado.

A marcação forte de RANK sinaliza a modulação celular realizada pelos osteoblastos no processo de remodelação óssea (CRAVO et al., 2012), indicando que o tecido está em atividade de reparo. Porém o OPG apresenta-se mais fortemente marcado, indicando que há uma proteção do tecido contra a reabsorção excessiva. Segundo Gerstenfeld et al.(2003), a expressão RANKL/OPG aumenta logo após a fase inicial da lesão, bem como durante o período de reabsorção. Isso pode indicar que aos 30 dias de reparo, o tecido ósseo está inibindo a reabsorção e favorecendo a formação óssea.

A ligação do RANKL (expresso pelos osteoblastos) e do RANK (expresso pelos osteoclastos) promove o processo de remodelação do tecido lesionado, já que a ativação dos osteoclastos favorece sua ação de reabsorção. Em um dado momento, não se sabe ainda o porquê, mas o OPG (expresso pelos osteoclastos) se liga ao RANKL, inibindo a ativação dos osteoclastos, podendo leva-los a apoptose. Assim, influenciando na ativação dos osteoblastos, que iram produzir a matriz orgânica do tecido ósseo, onde mais tardiamente será incorporada a hidroxiapatita e a fosfatase alcalina, durante o processo de mineralização. O que explica a marcação dessas células constantemente nas lâminas e a marcação do osteóide (matriz orgânica em processo de mineralização).

A marcação de FGF-2 no grupo G3 de 30 dias indica a presença de células do tecido conjuntivo, os fibroblastos. Esse resultado também confirma a análise histológica, que por sua vez apresentou tecido conjuntivo neoformado. Esses fibroblastos são produtores de colágeno, bastante importante para a matriz extracelular, que segundo Junqueira e Carneiro(2013), é o principal componente dessa matriz. Segundo Hurley et al.(2008), durante a formação intramembranosa a transcrição de FGF-2 encontra-se em osteoblastos e células mesenquimais, o que confirma a marcação constante dessas células na análise imunohistoquímica.

TGF- β é um fator de crescimento celular, diferenciação e desenvolvimento, pode estar envolvido com a formação de calos durante o reparo (BOLANDER, 1992; BOSTROM, 1998) e é capaz de induzir a expressão de proteínas da matriz extracelular.

A formação de calos depende do recrutamento de células tronco mesenquimais do tecido mole adjacente, córtex, periósteo e medula, nesse caso pode-se deduzir que essas células são provenientes do periósteo, confirmando a análise histológica que apresenta a marcação de tecido conjuntivo neoformado. Após esse recrutamento, ocorre uma cascata molecular produzindo colágeno I e II, o TGF- β é uma das moléculas responsáveis por esse efeito (CHO, 2002). Por isso há a presença de osteóide na análise histológica, onde o principal componente é o colágeno tipo I.

Os principais produtores de colágeno durante o processo de reparo do tecido ósseo são os fibroblastos e os osteoblastos. Diante disso, temos no G3 de 30 dias fatores importantes para o aumento desse colágeno, o laser e a esponja. O que provavelmente explique a marcação de inúmeros osteoblastos e fibroblastos pelos marcadores imunoistoquímicos.

A laserterapia de baixa intensidade estimula a expressão de fatores de crescimento, juntamente com a esponja de colágeno que também tem essa função. Dessa forma, essa característica pode ter influenciado na expressão do TGF- β que é um fator de crescimento importante para diferenciação, crescimento e desenvolvimento celular, como também na expressão do FGF-2 que é um fator de crescimento de fibroblastos.

Assim a laserterapia junta à esponja de colágeno tem uma ação mais intensificada quando em conjunto do que separadamente (SHIMOJI et al., 2010; CALIXTO et al., 2011; CUNHA et al., 2014)

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho trouxe resultados satisfatórios nos seguintes pontos:

- O grupo G3 de 30 dias foi significativamente melhor do que o grupo G0 quando avaliados as análises radiográficas, histológicas e imunohistoquímicas.
- O grupo G3, apesar de não ser estatisticamente significativo, quando comparado aos demais grupos tratados, mostrou-se bastante eficiente no reparo do defeito de tamanho crítico na calvária de ratos, tanto no período de 21 dias, como no período de 30 dias, radiograficamente e histologicamente.

REFERÊNCIAS

AMIN, A. R. et al. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. **Crit. Rev. Biomed. Eng.**, v. 40, n. 5, p.363-408, 2012.

ANNIBALI, S. A. et al. Comparative morphometric analysis of biodegradable scaffolds as carriers for dental pulp and periosteal stem cells in a model of bone regeneration. **J. Craniofac. Surg.**, v. 24, n. 3, p.866-71, 2013.

ARAUJO, A. A. et al. Azilsartan Increases Levels of IL-10, Down-Regulates MMP-2, MMP-9, RANKL/RANK, Cathepsin K and Up-Regulates OPG in an Experimental Periodontitis Model. **Plos One.**, v. 9, p. e96750, 2014.

BARBOS, P. A. L. et al. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. **J. Clin. Laser Med Surg.**, v. 21, n. 6, p. 383-8, 2003.

BERENGUEL, I. A. **Implantes das esponjas hemostáticas Gelfoam e Hemospon m alvéolos dentais em ratos após exodontia: estudo histológico e histométrico comparativo.** 2006. 133f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Marília (UNIMAR), São Paulo, 2006.

BOLANDER, M. E. Regulation of fracture repair by growth factors. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 200, n. 2, p.165-70, 1992.

BOSTROM, M. P. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, n. 355, p. 116-23, 1998. Supplement.

BURKITT, H. et. al. **Wheater's functional histology: a text and color atlas.** 3. ed. Luxembourg Belgium: Churchill-Livingstone, 1993.

CALIXTO J. C. et al. The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. **J. Craniofac. Surg.**, v. 39, n. 3, p. 215-20, 2011.

CAPLAN, A. I. Bone development and repair. **BioEssays.** v.6, n.4, p.171-175, 1987.

CATANZARO GUIMARÃES, S. A. **Patologia Básica da cavidade bucal.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

CEN, L et al. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. **Pediatr. Res.**, v. 63, n. 5, p. 492-6, 2008.

CHO, T. J. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. **J. Bone Min. Res.**, v. 17, n. 3, p. 513-20, 2002.

CRAVO, R. X. et al. RANKL/RANK/OPG: biomarcadores para estudos de metabolismo ósseo. **Rev. Trab. Acad.**, 2012. Disponível em: <<http://www.revista.universo.edu.br/index.php?journal=1reta2&page=article&op=view&path%5B%5D=652&path%5B%5D=476>> Acesso em: 16 abr.2015.

CUNHA, M. J. S. et al. Effect of low-level laser on bone defects treated with bovine or autogenous bone grafts : *in vivo* study in rat calvaria. **BioMed. Res. Intern.**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

DALLAS, S. L.; BONEWALD L. F. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 1192, p. 437-443, 2010.

DUNSTAN, C. R.; BOYCE, B. F. Animal models for the investigation of the action of factors on bone metabolism. In: _____ ARNETT, T. R.; HENDERSON, B. **Methods in Bone Biology**. United States: Chapman and Hall Ltd, 1998. p.290-304.

ERIKSEN, E. F. Cellular mechanisms of the bone remodeling. **Rev. End. Metab. Disord.**, v. 11, n. 4, p. 219-27, 2010.

FERNANDO, S. et al. A randomised double blind comparative study of low level laser therapy following surgical extraction of lower third molar teeth. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 31, n. 3, p. 170-2, 1993.

FREIRE M, O. et al. Antibody-mediated osseous regeneration: a novel strategy for bioengineering bone by immobilized anti-bone morphogenetic protein-2 antibodies. **Tissue Eng. Part A**, v. 17, n. 23-24, p. 2911-8, 2011.

FUJIHARA, N. A.; HIRAKI K. R.; MARQUES M. M. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. **Lasers Surg. Med.**, v. 38, n. 4, p. 332-6, 2006.

FUJIMURA, K. et al. Experimental studies on bone inducing activity of composites of atelopeptide type I collagen as a carrier for ectopic osteoinduction by rhBMP-2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 208, n. 1, p. 316-322, 1995.

GARCIA, V. G. et al. Effects of LLLT in combination with bisphosphonate on bone healing in critical size defects: a histological and histometric study in rat calvaria; **Lasers Med. Sci.**, v. 28, n. 2, p. 407-14, 2013.

GEIGER, M; LI, R. H.; FRIESS, W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 55, n. 12, p. 1613-29, 2003. 46

GERSTENFELD, L. C. et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. **J. Bone Miner. Res.**, v. 18, n. 9, p. 1584-92, 2003.

GUASTALDI, A. C. Biomaterial - ponderações sobre as publicações científicas. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, v. 58, n. 6, 2004.

GUZZARDELLA G. A. et al. Low-power diode laser stimulation of surgical osteochondral defects: results after 24 weeks. **Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.**, v. 29, n. 3, p. 235-44, 2011.

HABIBOVIC, P. Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. **J. Tissue Eng. Regen. Med.**, v. 1 n. 1, p. 25-32. 2007.

HADJIDAKIS, D. J.; ANDROULAKIS, I. I. Bone remodeling. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 1092, p. 385-96, 2006.

HONMA, T. et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. **Oral Dis.**, v. 14, n. 5, p.457-64, 2008.

HSU, E. L. A comparative evaluation of factors influencing osteoinductivity among scaffolds designed for bone regeneration. **Tissue Eng. Part A**, v. 15-16, p.1764-72, 2013.

HUBÁČEK, J.; POSPÍŠILOVÁ, J; HLOŽEK, Z. Effect of he-ne-laser on healing of wounds. In: 7, INTERNATIONAL CONGRESS LASER/OPTOELECTRONICS IN MEDICINE. Berlim. **Anais...**Berlim: Springer-Verlag, 1986. p.199-203.

HURLEY, M. M.; NASKI, M. C.; MARIE, P. J. Fibroblast Growth Factor (FGF) and FGF receptor families in bone. In: BILEZIKIAN, R. L.; RODAN G. **Principles of bone biology**. 3.ed. San Diego: Academic Press, 2007.

IYOMASA, M. M. Influence of low-level laser associated with osteogenic proteins recombinant human BMP-2 and Hevea brasiliensis on bone repair in Wistar rats. **Microsc. Res. Tech.**, v. 75, n. 2, p. 117-25, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KERT, J.; CHRISTENSEN, P. Clinical laser treatment of odontological conditions. In: ROSE, L. et al. **Clinical laser therapy: low level laser therapy**. Copenhagen: Scandinavian Medical Laser Technology, 1989.

KHAN, R.; KHAN, M. H. Use of collagen as a biomaterial: An update. **J. Indian Soc. Periodontol.**, v. 17, n. 4, p. 539–542, 2013.

KIGAMI, R. et. al. Effect of basic fibroblast growth factor on angiogenesis and bone regeneration in non-critical-size bone defects in rat calvaria. **J. Oral Sci.**, vol. 56, n. 1, p. 17-22, 2014.

KIM, B. S.; KIM, J. S.; LEE, J. Improvements of osteoblast adhesion , proliferation, and differentiation in vitro via fibrin network formation in collagen sponge scaffold. **J. Biomed. Mater. Res. Part A.**, v. 101, n. 9, p. 2661-6, 2013.

KIM, R. Y. et. al. The effect of dose on rhBMP-2 signaling, delivered via collagen sponge, on osteoclast activation and *in vivo* bone resorption. **Biomaterials.**, v. 35, n. 6, p. 1869-81, 2014.

KREISLER, M. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg. Med.**, v. 30, n. 5, p. 365-9, 2002.

LI, W. T.; LEU, Y. C. Effect of light emitting diode irradiation on proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. **J. Med. Biol. Eng.**, v. 26, p. 35-42, 2005.

LIEBERMAN, J. R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T. A. The role of growth factors in the repair of bone. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 84-A, n. 6, p. 1032-44, 2002.

LIZARELLI, R. F. Z. **Protocolos clínicos e odontológicos: uso do laser de baixa intensidade.** 4. ed. São Carlos: MMO, 2010.

LYONS, R. F. et. al. Biostimulation of wound healing *in vivo* by a helium-neon laser. **Ann. Plast. Surg.**, v. 18, n. 1, p. 47-50, 1987.

MARALDI, T. Human amniotic fluid-derived and dental pulp-derived stem cells seeded into collagen scaffold repair critical-size bone defects promoting vascularization. **Stem Cell Res. Ther.**, v. 4, n. 3, p. 53, 2013.

MARQUES, L. et. al. New LLLT protocol to speed up the bone healing process — histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. **Lasers Med. Sci.**, v. 4, p. 1225-30, 2015.

MOONEY, M. P.; SIEGEL, M. I. Animal model for bone tissue engineering of critical-sized. In: _____ HOLLINGER, J. O. et al (Eds.). **Bone tissue engineering**. London: CRC Press, 2005. p. 217-244.

MORRONE, G. et al. Osteochondral lesion repair of the knee in the rabbit after low-power diode GA–AL–AS laserbiostimulation: an experimental study. **Artif. Cells blood Substit. Immobil. Biotechnol.**, v. 28, n.4, p. 321-63, 2000.

NAGATA, M. J. H. A proporção plasma rico em plaquetas/enxerto ósseo autógeno pode influenciar o reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico: um estudo radiográfico em calvária de ratos. **Rev. Odontol. UNESP.**, v. 40, n. 6, p. 325-331, 2011.

OLIVEIRA, E. L. O. et. al. Low Level Laser Therapy (LLLT) Reduces Inflammatory Infiltrate and Enhances Skeletal Muscle Repair : Histomorphometric Paramet ⁴⁸ **Laser Phys.**, v. 22, n. 9, p. 1–6, 2012.

PACIFICI, R. The immune system and bone. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 503, n. 1, n. 41-53.

PÉREZ-SÁNCHEZ, M. J. et al. Biomaterials for bone regeneration. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 15, n. 3, p. 517-22, 2010.

PINHEIRO, A. L. Effect of Low Level Laser Therapy on the Repair of Bone Defects Grafted with Inorganic Bovine Bone. **Braz. Dent. J.**, v. 14, n. 3, p. 177-81, 2003.

PINHEIRO, A. L. P., Laser em odontologia: seu uso atual e perspectivas futuras. **Rev. Gauch. Odontol.**, v.40, n. 5, p. 327-32, 1992.

HUBÁČEK, J.; POSPÍŠILOVÁ, J.; HLOŽEK, Z. Effect of He-Ne-Laser on Healing of Wounds. In: 7, INTERNATIONAL CONGRESS LASER/OPTOELECTRONICS IN MEDICINE. Berlin. **Anais...Berlin**: Springer-Verlag, 1986. p. 199-203.

PRETEL, H.; LIZARELLI, R. F; RAMALHO L. T. Effect of low-level laser therapy on bone repair : Histological Study in Rats. **Lasers Surg. Med.**, v. 39, n. 10, p. 788-96, 2007.

RICCIO, M. et. al. Human dental pulp stem cells produce mineralized matrix in 2D and 3D cultures. **Eur. J. Histochem.**, v. 54, n. 4, p. 46, 2010.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 205, p. 299-308, 1986.

SCHNEIDER, R. A.; HELMS, J. A. Development and regeneration of the musculoskeletal system.v. 9, n. 6. **Curr. Opin. Orthop.**, 1998.

SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblast and surface osteoblastos. **Eur. Cells Mater.**, V. 1, p. 15-53, 2008.

SHIMOJI, S. et. al. Bone perforation and placement of collagen sponge facilitate bone augmentation.**J. Periodontol.**, v. 80, n. 3, p. 505-11, 2009.

SIESSERE, S. et. al. Application of low-level laser irradiation (LLLI) and rhBMP-2 in critical bone defect of ovariectomized rats: histomorphometric evaluation. **Photomed. Laser Surg.**, v. 29, n. 7, p. 453-8, 2011.

SILVA, E. M. et. al. Avaliação histológica da laserterapia de baixa intensidade na cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo: estudo experimental em ratos.**RSBO.**, n. 4, p. 29-35, 2007.

SINGH, A. et al. Immunoregulation of bone remodelling. **J. Crit. Illn. Inj. Sci**, v. 2, n. 2, p.75-81, 2012.

SOARES, L. G. P. et al. Influence of the 780 nm laser light on the repair of surgical bone defects grafted or not with biphasic synthetic micro-granular hydroxylapatite + Beta-Calcium triphosphate. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 131, p. 16-23, 2014.

STEVENS, M. M. Biomaterials for bone tissue engineering. **Mater. Today**, v. 11, n. 5, p. 18-25, 2008.

SULEWSKI, J. G. Historical survey of laser dentistry. **Dent. Clin. North Am.**, n. 44, v. 4, p. 717-52, 2000.

SUMITA, Y et al. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 17, p. 3238-48, 2006.

SZPALSKI, C. et. al. Cranial bone defects: current and future strategies. **Neurosurgery Focus**, v. 29, n. 6, 2010.

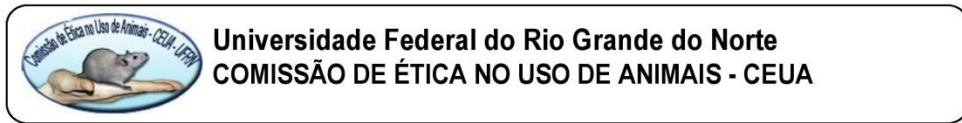
TIMOTHY, R.; ARNETT, B. H. Methods in Bone Biology. In:_____DUNSTAN, C. R.; BOYCE, B. F. **Animal models for the investigation of the action of factors on bone metabolism**. London: Chapman & Hall, 1998, p. 290-304.

TRELLES, M. A.; MAYAYO, E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. **Lasers Surg. Med.**, v. 7, n. 1, p. 36-45, 1987.

VASCONCELLOS, L. M. et al. Healing of normal and osteopenic bone with titanium implant and low-level laser therapy (GaAIIAs): A histomorphometric study in rats. **Lasers Med. Sci.**, v. 29, n. 2, p. 575-80, 2014.

VISSER, R. et. al. The effect of an rhBMP-2 absorbable collagen sponge-targeted system on bone formation *in vivo*. **Biomaterials**, v. 30, n. 11. p. 2032-7, 2009.

ANEXOS



PROTOCOLO N.º 067/2014 (3)

Professor/Pesquisador: *JOSÉ SANDRO PEREIRA DA SILVA*

Natal (RN), 06 de abril de 2015.

Prezado Professor/Pesquisador,

Vimos, através deste documento, informar que o projeto "LASER TERAPIA COMBINADA A ESPONJA DE COLÁGENO EM UM MODELO DE REPARO ÓSSEO", após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a **elaboração de relatório que deverá ser entregue tão logo a pesquisa seja concluída.**

Relatório: **AGOSTO 2015.**

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,

Josy Carolina Covan Pontes
Coordenadora da CEUA

