

LORENA FERRAZ SANTOS SILVA

PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



**Avaliação comparativa da membrana de fibrina
rica em plaquetas irradiada ou não com laser de
diodo em defeito ósseo crítico:
estudo experimental em ratos**

Salvador
2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE PROCESSOS
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**

LORENA FERRAZ SANTOS SILVA

**Avaliação comparativa da membrana de fibrina
rica em plaquetas irradiada ou não com laser de
diodo em defeito ósseo crítico:
estudo experimental em ratos**

**Salvador, Ba
2019**

LORENA FERRAZ SANTOS SILVA

Avaliação comparativa da membrana de fibrina rica em plaquetas irradiada ou não com laser de diodo em defeito ósseo crítico: estudo experimental em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Maria Pedreira Ramalho.
Coorientadora: Profa. Dra. Tânia Tavares Rodrigues

Salvador, BA
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S586a Silva, Lorena Ferraz Santos
Avaliação comparativa da membrana de fibrina rica em plaquetas irradiada ou não com laser de diodo em defeito ósseo crítico: Estudo experimental em ratos./ Lorena Ferraz Santos Silva.-- Salvador-BA, 2019.
69f.

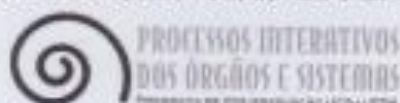
Orientador: Profa. Dra. Luciana Maria Pedreira Ramalho
Coorientador: Profa. Dra. Tânia Tavares Rodrigues
Dissertação (Mestrado - Programa De Pós-graduação Em Processos Interativos De Órgãos E Sistemas) – Universidade Federal Da Bahia, 2019.

1. Fibrina em plaquetas. 2. Terapia com luz de baixa intensidade. 3. Regeneração
I. Pedreira Ramalho, Luciana Maria. II.
Tavares Rodrigues, Tânia. III. Título.

CDD: 621.3

Bibliotecária: Taise Oliveira Santos CRB 5/1853

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO

LORENA FERRAZ SANTOS SILVA

Avaliação Comparativa da Membrana de Fibrina Irradiada ou Não com Laser Diodo em
Defeito Ósseo: Estudo Experimental em Ratos

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROFA DRA LUCIANA MARIA PEDREIRA RAMALHO (Universidade Federal da Bahia)

PROFA DRA VIVIANE PALMEIRA DA SILVA (Universidade Federal da Bahia)

PROF DR JORGE MOREIRA PINTO FILHO (União Metropolitana de Educação e Cultura)

Dedico este trabalho a Deus, por ser
essencial em minha vida, meu guia e socorro
presente na hora da angústia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte de toda sabedoria e conhecimento, por sempre ter renovado minhas forças e atendido às minhas orações, estando comigo em todos os momentos, mesmo nos mais difíceis, pois era quando estava mais presente.

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, o estímulo e o empenho de diversas pessoas. Gostaria de expressar toda a minha gratidão e o apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho se tornasse uma realidade. A todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer à minha orientadora, professora Luciana Maria Pedreira Ramalho, por ter me aceitado como sua orientanda, pelo incentivo dado ao meu projeto de pesquisa, por toda a paciência, todo o empenho e o sentido prático com que sempre me orientou neste trabalho. Como amiga, é o que todos desejamos, já que está sempre ao nosso lado, sem precisarmos pedir o que quer que seja. Muito obrigada pelo zelo e por ter me corrigido quando necessário. A sua forma exigente, crítica e criativa de arguir as ideias apresentadas estão contribuindo para a minha formação e para o alcance dos objetivos propostos nesta dissertação.

Desejo igualmente agradecer aos professores Jorge Moreira Pinto Filho e Bruno Botto de Barros de Silveira, que embarcaram comigo em um projeto de pesquisa audacioso devido às limitações encontradas. Ambos estiveram sempre empenhados em transmitir seus conhecimentos e sempre disponíveis para esclarecer e tirar as dúvidas que iam surgindo ao longo do caminho. Obrigada por tudo!

À professora Tânia Tavares Rodrigues, agradeço a colaboração com os seus conhecimentos veterinários e sua ajuda durante o manuseio com os animais.

À Dr^a Viviane Palmeira, pela presença em minha banca de qualificação e todas as sugestões e atenção dadas.

À professora Dra Maria Cristina Cangussu, pelo apoio e prestatividade com que me atendeu e pelo conhecimento transmitido.

Gostaria de deixar dois agradecimentos muito especiais. Em primeiro lugar, à Dr.^a Livia Ribeiro, minha amiga e colega desde a iniciação científica na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA). Agradeço os momentos que partilhamos na construção deste trabalho referente à parte escrita, pela amizade, pelo incentivo, pelas suas reflexões críticas, e pela ajuda na revisão dos textos. E em segundo lugar, à Larissa Nakamura, pela revisão do trabalho em tempo hábil e pela atenção.

Aos secretários do PIOS, em especial, à Carlos Alberto Santos e a Tarcísio Mikelly Vivas, pela dedicação ao programa e aos alunos, pela atenção dada toda vez que solicitada. Parabéns pelo trabalho desempenhado.

Ao técnico do Laboratório de Anatomia Patológica na Faculdade de Odontologia da UFBA, Edilson Silva, por ter feito as lâminas da minha pesquisa de forma a viabilizar a obtenção dos resultados apresentados.

Aos colegas do Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, pelo companheirismo. Em especial, à amiga Dr.^a Ilana Dantas Neves pelos momentos difíceis compartilhados.

À coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, agradeço pelo apoio, pelos ensinamentos e pela dedicação ao programa.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, por ter me acolhido durante esta nova etapa da minha formação.

Às amigas, pelo apoio, pela torcida e paciência quando não podia comparecer aos encontros ou à falta de atenção devido à produção da dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pesquisa durante o período um ano de realização deste trabalho.

Não menos importante, agradeço imensamente aos meus pais, à minha irmã e ao meu namorado que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Silva, LF. Avaliação comparativa da membrana de fibrina rica em plaquetas irradiada ou não com laser de diodo em defeito ósseo crítico: estudo experimental em ratos. 2019. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

RESUMO

FUNDAMENTO: A perda óssea pode ser resultante de alguns fatores etiológicos como traumas, lesões patológicas ou atrofia tecidual após a perda das unidades dentárias. A busca por procedimentos que auxiliem ou induzam ao reparo ósseo para restabelecer o padrão anatômico tem aumentado. A membrana autóloga de fibrina rica em plaquetas (PRF) tem sido utilizada para auxiliar o processo de neoformação óssea, demonstrando bons resultados, assim como a laserterapia de baixa intensidade (LBI). **Objetivo:** Investigar o efeito da LBI ($\lambda = 830$ nm) com o uso da membrana de PRF na neoformação óssea. **Metodologia:** Foram utilizados 63 ratos da raça Wistar. Estes animais foram divididos em 04 grupos: C (controle), L (laser), PRF (PRF) e PRFL (PRF e laser). As membranas de PRF foram obtidas a partir de punção intracardíaca de ratos doadores. Um defeito ósseo foi criado na calvária de 48 ratos Wistar e os grupos irradiados passaram pela primeira sessão de laserterapia logo após o procedimento cirúrgico. Seis animais de cada grupo foram eutanasiados após 30 e 60 dias e processados histologicamente. Foram avaliadas a neoformação óssea, a espessura óssea, a atividade osteoblástica, a intensidade inflamatória e a formação de tecido conjuntivo/fibrose. **Resultados:** As maiores porcentagens médias de neoformação óssea aos 30 dias (PRF - 66,67% e PRFL - 60%) e 60 dias (PRFL - 80%) foram observadas nos defeitos utilizando PRF. Em 30 dias, os grupos PRF e PRFL apresentaram resultados semelhantes de espessura óssea vertical e ambos apresentaram diferença estatística em relação aos demais grupos ($p = 0,002$). Em particular, a porcentagem de espessura óssea vertical em 60 dias foi significativamente maior no grupo PRFL do que a dos demais grupos ($P = 0,025$). Em 30 e 60 dias, a atividade osteoblástica foi maior no grupo PRF ($p = 0,000$ e $p = 0,020$, respectivamente). Em todos os momentos avaliados, a atividade inflamatória não diferiu entre os grupos. A presença de tecido conjuntivo/fibrose após 30 dias foi maior no grupo PRFL ($p = 0,025$), embora o grupo PRF não tenha apresentado esse tecido nos dois períodos experimentais. Entretanto, após 60 dias, o grupo DPRFL apresentou média de (80%) dos defeitos sem a presença de tecido conjuntivo. **Conclusão:** Observou-se que o uso da membrana de PRF favoreceu a neoformação óssea e quando associada ao bioestimulador, a LBI, promoveu maior ganho em espessura óssea.

Palavras-chave: Fibrina rica em plaquetas. Terapia com luz de baixa intensidade. Regeneração óssea.

Silva, LF. Comparative evaluation of platelet-rich fibrin membrane irradiated or not with diode laser in critical bone defect: experimental study in rats. 2019 Master Dissertation – Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

ABSTRACT

BACKGROUND: Bone loss may result from some etiological factors such as trauma, pathological injuries or tissue atrophy after tooth loss. The pursuit for procedures that help or induce bone repair to reestablish the anatomical pattern has increased. The autologous platelet-rich fibrin (PRF) membrane has been used to help the bone neoformation process, showing good results, as well as low-level laser therapy (LLLT). **Objective:** Investigate the effect of LLLT ($\lambda = 830$ nm) along with the PRF membrane in bone neoformation. **Methodology:** 63 Wistar rats were used. These animals were divided into 04 groups: C (control), L (Laser), PRF (PRF) and PRFL (PRF and Laser). The PRF membranes were obtained from intracardiac puncture of donor rats. A bone defect was created in the calvaria of 48 Wistar rats and the irradiated groups went through the first session of laser therapy shortly after the surgical procedure. Six animals from each group were euthanized after 30 and 60 days and histologically processed. Bone neoformation, bone thickness, osteoblast activity, inflammatory intensity and connective tissue formation / fibrosis were evaluated. **Results:** The highest average percentages of bone neoformation at 30 days (PRF -66.67% and PRFL - 60%) and 60 days (PRFL - 80%) were observed in defects using PRF. At 30 days, the PRF and PRFL groups presented similar results of vertical bone thickness and both showed statistical difference compared to the other groups ($p = 0.002$). In particular, the percentage of vertical bone thickness at 60 days was significantly higher in the PRFL group than in the other groups ($P = 0.025$). At 30 and 60 days, osteoblast activity was higher in the PRF group ($p = 0.000$ and $p = 0.020$, respectively). At all times evaluated, inflammatory activity did not differ between groups. The presence of connective tissue / fibrosis after 30 days was higher in the PRFL group ($p = 0.025$), although the PRF group did not present this tissue in both experimental periods. However, after 60 days, the PRFL group presented an average of (80%) of the defects without the presence of connective tissue. **Conclusion:** It was observed that the use of the PRF membrane favored bone neoformation and when associated with the biostimulator, the LLLT, promoted greater gain in bone thickness.

Keywords: Platelet rich fibrin. Low intensity light therapy. Bone regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (a) Coágulo de PRF. (b) Coágulo removido. (c) Membrana de fibrina.....	40
Figura 2 – Tricotomia prévia ao procedimento cirúrgico.....	41
Figura 3 – (a) Defeito ósseo em calota craniana de rato. (b) Remoção de tampão ósseo preservando a dura-máter.....	42
Figura 4 – (a) e (b) – Membrana de PRF posicionada em defeito ósseo.....	42
Figura 5 – Peça cirúrgica enviada ao laboratório.....	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Variáveis, parâmetros e categorização da avaliação histológica.....	44
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolos de LBI.....	28
Tabela 2 – Comparação entre os grupos após 30 dias.....	47
Tabela 3 – Comparação entre os grupos após 60 dias.....	48
Tabela 4 – Avaliação do grupo C entre os tempos (30 e 60 dias).....	49
Tabela 5 – Avaliação do grupo L entre os tempos (30 e 60 dias)	50
Tabela 6 – Avaliação do grupo PRF entre os tempos (30 e 60 dias)	51
Tabela 7 – Avaliação do grupo PRFL entre os tempos (30 e 60 dias)	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	–	molécula energética das células
A-PRF	–	Advanced-PRF
bFGF	–	fator de crescimento fibroblástico básico
BMPs	–	proteínas ósseas morfogenéticas
β -TCP	–	fosfato beta-tricálcico
CBFA1	–	do inglês: Core-binding factor alpha (1)
CEUA	–	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	–	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP	–	concentrado plaquetário
D	–	defeito ósseo
DL	–	defeito ósseo e laserterapia
DNA	–	ácido desoxirribonucleico
DPRF	–	defeito ósseo e PRF
DPRFL	–	defeito ósseo + PRF + laserterapia
EDTA	–	ácido etilenodiamino tetra-acético
FGEV	–	fator de crescimento endotelial vascular
FGI	–	fator de crescimento semelhante à insulina
FGDP	–	fator de crescimento derivado de plaquetas
GaAlAs	–	Arseneto de gálio e alumínio/ laser de diodo
(HAp)	–	Hidroxiapatita
HE	–	Hematoxilina-Eosina
ICS	–	Instituto de Ciências da Saúde
IGF	–	fator semelhante à insulina
LBI	–	laserterapia de baixa intensidade
NRS	–	escala de classificação numérica da dor

PHT	–	hormônio paratormônio
PDGF	–	fator de crescimento derivado de plaquetas
POH	–	perda óssea horizontal
POV	–	perda óssea vertical
PPP	–	do inglês: Platelet-Poor Plasma
PRF	–	do inglês: Platelet Rich Fibrin - Fibrina rica em plaquetas
PRP	–	do inglês: Platelet-Rich Plasma
RER	–	retículo endoplasmático rugoso
RNA	–	ácido ribonucleico
ROG	–	regeneração óssea guiada
RTL	–	redução total da largura
RUNx-2 relacionado a runt	–	do inglês: Runt-related transcription factor 2 - fator de transcrição 2
TGF- β	–	fator de transformação- β
TGF β 1 e β 2	–	fator de crescimento transformante β 1 e β 2
TGF-b1	–	fator de crescimento beta 1
TMC	–	tomografia microcomputadorizada
TFBM	–	terapia fotobiomoduladora
UFBA	–	Universidade Federal da Bahia
VEGF	–	fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo primário	18
2.2 Objetivos secundários	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Tecido ósseo (Anatomia e histologia).....	19
3.1.2 <i>Organização tecidual</i>	20
3.1.3 <i>Tipos celulares</i>	21
3.1.4 <i>Remodelação óssea</i>	23
3.2 Laserterapia de baixa intensidade.....	25
2.3 Concentrados plaquetários.....	32
4 METODOLOGIA	39
4.1 Amostra.....	39
4.2 Preparo da membrana de PRF	40
4.3 Procedimento cirúrgico.....	41
4.4 Parâmetros da fotobiomodulação com Laser	43
4.5 Morte dos animais	43
4.6 Processamento histológico.....	44
4.7 Análise de dados	44
4.8 Análise estatística	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Avaliação entre os grupos	46
5.2 Avaliação por grupo	48
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÕES	58
8 REFERÊNCIAS	59
9 ANEXO A	69

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido metabolicamente ativo que sofre contínua remodelação ao longo da vida. Este processo envolve a remoção de osso mineralizado pelos osteoclastos, seguido pela formação da matriz óssea pelos osteoblastos. Nos ossos gnáticos, a perda dentária leva à reabsorção do osso alveolar em regiões de maxila e de mandíbula, causando defeitos em altura, largura e espessura (1). Na busca da excelência em reabilitação oral, a cirurgia de implante dentário criou uma grande demanda para as reconstruções dentoalveolares. Entretanto, um dos grandes desafios da implantodontia é a neoformação do osso alveolar reabsorvido e, por conta disto, muitos estudos têm sido desenvolvidos para entender o processo do reparo ósseo e desenvolver estratégias a fim de acelerar o tempo necessário da osseointegração de implantes dentários, sem comprometer os resultados mecânicos e a integração tecidual.

Para regenerar o osso alveolar perdido, várias estratégias têm sido desenvolvidas (2, 3). Dentre elas, pode-se citar a regeneração óssea guiada (ROG), utilizando membranas artificiais (3), enxertos ósseos, (4), fatores de crescimento (5) e proteínas (6) para tal fim. Dentre estas estratégias, um biomaterial derivado de produtos do sangue, que contém concentração sérica de fatores de crescimento, tem atraído atenção nos últimos anos.

Os enxertos ósseos autógenos ainda são considerados o padrão ouro para a neoformação óssea, porém eles requerem longas cirurgias e estão associados à morbidade dos sítios doadores, incluindo infecção, dor e formação de hematoma. Além disso, em grandes defeitos ósseos, esses enxertos são frequentemente reabsorvidos antes de terem concluído a osteogênese (7, 8). Por conta disso, cada vez mais se tem utilizado os substitutos ósseos, os quais têm demonstrado boas propriedades osteocondutivas em estudos clínicos (9). Por outro lado, é importante saber que esses substitutos ósseos não possuem propriedades osteogênicas e osteoindutivas, e o seu uso desencadeia tempo de cicatrização prolongado, tendo sua disponibilidade por tempo limitado, impactando de forma negativa nas respostas imunes, além de ter um custo elevado. Ainda assim, sua aplicação é estabelecida como padrão para a ROG.

Para contornar as deficiências encontradas nos substitutos ósseos, novos materiais com propriedades osteoindutoras estão sendo estudados, como a fibrina rica em plaquetas (PRF). O seu uso tem sido de forma isolada ou associada com enxertos ósseos, principalmente em procedimentos que visam à regeneração óssea. A aplicação desse

mediador biológico com propriedades osteoindutoras foi relacionada à redução do tempo de reparo ósseo (10), a um aumento da angiogênese e à diminuição do infiltrado inflamatório (11). Além destas propriedades, foi observado que a fibrina autóloga possui altas concentrações de fatores de crescimento (12) e de células imunes do hospedeiro, as quais atuam promovendo o reparo local de feridas e combatendo infecções.

Em relação à sua obtenção, a PRF é formada a partir de uma pequena quantidade de sangue coletada sem anticoagulantes e é centrifugada imediatamente (13). A formação de um coágulo de fibrina e a ativação plaquetária são induzidas pela ativação da cascata de coagulação durante a centrifugação (14).

Destaca-se também que todos os protocolos desenvolvidos para a obtenção da PRF se caracterizam pelo fácil método e baixo custo, garantindo um índice de rejeição quase que nulo. Além disso, devido ao seu fácil método de obtenção e à sua resistente rede de fibrina, (15) esse biomaterial tem sido utilizado de forma eficaz no tratamento de defeitos ósseos. Estudos sugerem que seu uso de forma isolada ou associada a enxertos autógenos (15), xenoenxertos (16) e fosfato beta-tricálcico (β -TCP) (16) estimula e aumenta a regeneração óssea. Assim, é de grande interesse para a odontologia o uso desse concentrado plaquetário em terapias que visem ao reparo ósseo.

Outra opção para contribuir com o reparo ósseo é a laserterapia de baixa intensidade (LBI) (18). Esta caracteriza-se por não ser invasiva, cujo método de ação é uma aplicação de radiação eletromagnética não ionizante, coerente e direcional com comprimentos de onda entre os espectros visível e infravermelho (19). Tal procedimento acelera o reparo ósseo em sua fase inicial através da diferenciação e da proliferação dos osteoblastos (20), atua na angiogênese (21) e na organização das fibras de colágeno.

Além disso, o laser possui a vantagem de não causar efeitos colaterais sistêmicos para os pacientes, e é também sabido que a LBI estimula a deposição de íons de cálcio e de fósforo na matriz óssea (22). Estudo mostra que houve ganho ósseo quando se utilizou a LBI associada a outros biomateriais (23), no entanto não há relatos sobre a associação de LBI e a membrana de PRF em defeitos ósseos críticos em calvária de ratos.

As evidências científicas demonstram que, isoladamente, a PRF e o laser de baixa intensidade possuem potenciais terapêuticos significativos na qualidade da neoformação óssea em processos de reparo tecidual. Portanto, hipotetizamos que a combinação PRF/LBI

potencializaria tais efeitos. Dessa forma, o objetivo deste estudo é avaliar a qualidade óssea formada em defeito ósseo crítico confeccionado na calvária de ratos, utilizando a membrana de PRF associada ou não ao laser de diodo ou ao laser de baixa intensidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

– Avaliar a neoformação óssea induzida pelo uso da membrana de PRF com aplicação do laser de diodo.

2.2 Objetivos secundários

– Avaliar os processos inflamatório e de reparo em ratos submetidos a defeito ósseo crítico em calvária.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Tecido ósseo (Anatomia e histologia)

Os ossos são tecidos que suportam o movimento, fornecem esqueleto ao corpo e protegem os órgãos. Além de promover a sustentação do organismo, o tecido ósseo igualmente realiza a hematopoiese, regula o pH do sangue (24), promove a troca contínua de cálcio e de fósforo com o plasma, constitui reserva de gordura e compõe sistemas de alavancas nas articulações, garantindo ampla movimentação de várias partes do corpo. (25).

O osso é constituído basicamente por dois componentes: orgânicos e inorgânicos. A porção orgânica é formada por células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos), fibras colágenas e substância base (proteoglicanos e glicoproteínas). A parcela orgânica da matriz óssea é secretada principalmente pelos osteoblastos. O principal componente inorgânico é o fosfato de cálcio, responsável por dois terços do peso ósseo. O fosfato de cálcio interage com o hidróxido de cálcio transformando-se em hidroxiapatita. Conforme ocorre a formação dos cristais de hidroxiapatita, outros materiais inorgânicos como o carbonato de cálcio, o sódio, o magnésio e o fluoreto vão se incorporando a ele. (26)

Como os demais conjuntivos, o tecido ósseo é estudado histologicamente segundo a morfologia de suas células e as particularidades do material extracelular. Os componentes celulares provêm de duas linhagens, ambas mesenquimais – a célula osteoprogenitora, que origina osteoblastos e osteoclastos. E a partir das células mesenquimais indiferenciadas que se originam as células osteoprogenitoras, chamadas células-tronco do adulto ou “células-fonte”, que persistem como células ósseas de revestimento no perióstio e, segundo alguns autores, no endóstio. (27, 28)

As células osteoprogenitoras surgem, morfológicamente, a partir da contração dos prolongamentos citoplasmáticos da célula mesenquimal e da diminuição de volume total celular; geneticamente, nesta fase, ocorre a transcrição de genes específicos, como o CBFA1 (expressão induzida fisiologicamente e sinteticamente pela proteína morfogenética osteoindutora-7) e RUNx-2, sendo este o primeiro passo para que a célula mesenquimal indiferenciada seja, futuramente, uma célula osteoprogenitora e não qualquer outra da linhagem mesenquimal, como fibroblastos, condroblastos ou lipoblastos. Ainda, fatores de crescimento como a leptina, o fator semelhante à insulina (IGF), o fator de transformação- β (TGF- β) e o fator derivado de plaquetas (PDGF) participam, isolados ou combinados, do

estímulo para a diferenciação das células mesenquimais em células osteoprogenitoras e destas para osteoblastos ativos ou em repouso (células ósseas de revestimento). (27, 28)

A interação morfofuncional entre as células ósseas possibilita a renovação tecidual e a manutenção da normocalcemia. Tal interação origina as atividades de modelamento e de remodelamento, controladas por fatores intracelulares (desencadeados por osteoblastos), por hormônios e por estímulos locais extrínsecos, como a aplicação de força mecânica fisiológica. (29)

3.1.2 Organização tecidual

No desenvolvimento dos ossos longos, chamamos o corpo do osso de diáfise e sua extremidade, de epífise. A diáfise é formada por medula óssea circundada por osso compacto, que constitui uma densa barreira protetora. Geralmente mais larga que a diáfise, a epífise é formada principalmente de osso esponjoso, o qual é constituído por uma trama de ossos trabeculares e medula óssea amarela ou vermelha, bem como uma fina e externa camada de osso compacto (Figura 1). Nos ossos em crescimento, o ponto de união da diáfise com a epífise é denominado metáfise. Nesta junção, existe uma placa de crescimento formada por cartilagem hialina, chamada de placa epifiseal ou fise de crescimento. Quando o processo de desenvolvimento é finalizado, a placa epifiseal é substituída pela linha epifiseal. (30)

Os ossos que compõem o esqueleto são constituídos por dois tipos de tecidos ósseos: compacto ou cortical, e esponjoso ou trabecular (ou ainda, medular). Ambos são revestidos externamente pelo perióstio e, internamente, pelo endóstio, e apresentam as mesmas moléculas e tipos celulares conhecidos. O que difere esses dois tipos de tecido ósseo é a organização estrutural dessas moléculas e células, resultando em diferentes arranjos e propriedades mecânicas.

- **Tecido ósseo compacto**

A unidade estrutural do osso compacto é denominada ósteon ou sistema Haversiano. (Figura 3). Cada ósteon aparece como uma unidade cilíndrica lamelar de matriz óssea que envolve os canais de Havers. O sistema haversiano corre paralelo ao eixo longo do osso e carrega pequenas artérias e veias. O canal de Volkmann se dispõe perpendicularmente ao eixo longo do osso, e está ligado à circulação sanguínea e aos nervos do perióstio através do canal de Havers. Os canais de Havers e de Volkmann conectam a cavidade medular

óssea à circulação por intermédio dos vasos sanguíneos, formando caminhos para que as células sanguíneas possam atingir a circulação. (31)

3.1.3 Tipos celulares

Os tipos celulares presentes nos ossos variam de acordo com o tecido envolvido, a localização na matriz óssea e as funções que desempenham. Nas trabéculas do osso esponjoso existem várias populações celulares envolvidas com o processo de divisão celular para a reposição de células de diferentes linhagens e funções encontradas no sangue e nos tecidos. As células sanguíneas são altamente especializadas, capazes de desempenhar suas respectivas funções no momento em que ganham acesso à corrente sanguínea. Em geral, elas não circulam até que sua proliferação tenha terminado, atingindo o nível necessário de maturação.

As populações celulares encontradas nesse microambiente são denominadas células mesenquimais. Estas células são pluripotentes e indiferenciadas, podendo dar origem a diversos tecidos do nosso organismo, além de participar da manutenção, do reparo e do controle da homeostasia. As células indiferenciadas podem iniciar o processo de diferenciação com a ativação e inativação de determinados genes, alterando seu fenótipo celular. Uma vez que a célula tenha iniciado esse processo, sua taxa proliferativa cai e, de acordo com seu nicho celular, ela gera a linhagem a qual se comprometeu inicialmente.

Ainda em relação à composição celular do tecido ósseo, as células osteoprogenitoras estão localizadas na medula óssea e podem originar, de acordo com os estímulos específicos, células ósseas maduras, condroblastos ou até mesmo fibroblastos (32). As células osteoprogenitoras são pequenas, apresentam coloração pálida, são fusiformes e podem ainda ser encontradas nos tecidos conjuntivos perivasculares, nas superfícies do tecido ósseo, o endóstio e o perióstio (32, 33). As células osteoprogenitoras, no início de seu processo de diferenciação, geram células denominadas pré-osteoblastos.

Os pré-osteoblastos, por seu turno, se diferenciam em osteoblastos maduros e, ao final do processo, em osteócitos. Cada tipo celular apresenta características morfológicas e funções diferentes alterando, por exemplo, sua atividade de síntese proteica. Alguns osteoblastos podem permanecer como células de reserva na superfície óssea constituindo as chamadas “bone lining cells” (células de revestimento ósseo). (34)

As células de revestimento ósseo protegem o tecido ósseo subjacente contra fluidos extracelulares e contribuem na regulação dos fluxos dos íons cálcio e fósforo para dentro e para fora da estrutura óssea. São células possivelmente derivadas de osteoblastos que cessaram sua atividade, mas podem retornar ao estado de célula osteoprogenitora por um processo ainda não bem elucidado. (34)

Portanto, as células osteoprogenitoras do tecido ósseo, os osteoblastos e os osteócitos são células derivadas da linhagem osteoblástica presente no interior do osso esponjoso. Entretanto, os osteoclastos não compartilham da mesma linhagem de diferenciação, sendo derivados de células progenitoras mononucleadas da linhagem de monócitos/macrófagos.

- **Osteoblastos**

Os osteoblastos ativos apresentam intensa atividade de síntese dos componentes da matriz óssea. Nesse momento, seu fenótipo celular é cuboide, com citoplasma basófilo, núcleo excêntrico e nucléolo proeminente. Possui inúmeros retículos endoplasmáticos rugosos (RER) e muitas lamelas do aparelho de Golgi. Essas organelas são conhecidamente abundantes em células com intensa atividade secretora. (35)

Além de colágeno tipo I (Col I), os osteoblastos sintetizam proteínas não colagênicas, fatores de crescimento específicos, prostaglandinas, colagenases e fosfatase alcalina. Esta última parece estar envolvida na sinalização transmembranar e tem função na regulação da migração e da diferenciação dos osteoblastos (34). Uma outra função dos osteoblastos é participar na nucleação do mineral ósseo cristalino nas fibras de Col I.

Os pré-osteoblastos são semelhantes aos osteoblastos, porém não sintetizam Col I, nem osteocalcina, sialoproteína e osteopontina. São estimulados por glicocorticoides e por proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) a iniciar o processo de diferenciação e a ativação da atividade de produção da matriz óssea. A palavra morfogenética significa que elas induzem à formação de um osso inteiramente novo. Sendo assim, têm a capacidade de iniciar o que é denominado como “a fase morfogenética do desenvolvimento ósseo”, que inclui a migração, a agregação e a proliferação das células do tipo mesenquimal e sua subsequente diferenciação em células osteoprogenitoras. (25)

- **Osteócitos**

Os osteócitos são células ósseas maduras de maior população, com formato de aranha, encontradas em pequenas cavidades das junções lamelares chamadas de lacunas. Somente um osteócito é encontrado por lacuna e essas células não podem se dividir. Numerosos processos alongam-se de cada osteócito para dentro dos canalículos, passando rapidamente pela matriz de mineralização e se conectando a uma lacuna adjacente. Então, há uma rede de comunicação entre o canalículo e a lacuna, fazendo com que o processo ocorra em todo o osso mineralizado. O canalículo é importante porque é dele que provém a rota pela qual o processo de um osteócito pode se contactar aos outros adjacentes. Portanto, todos os osteócitos são capazes de se comunicar entre si, carregando informações e nutrientes. Os osteócitos podem sintetizar ou absorver a matriz óssea e, caso sejam destruídos, a reabsorção da matriz óssea ocorrerá devido à atividade do osteoclasto, que é sucedida pela reparação ou pela remodelação através da atividade osteoblástica. (36, 31)

- **Osteoclastos**

Os osteoclastos são células multinucleadas gigantes envolvidas na reabsorção do osso e, portanto, estão presentes em áreas onde o osso está sendo removido. O osso também contém um pequeno número de células mesenquimais conhecidas como células osteoprogenitoras, que estão localizadas na camada celular do perióstio, no endóstio e na linha vascular de passagem da matriz medular. São dessas células que se originam os osteoblastos e, portanto, são importantes para a reparação das fraturas. (36, 31)

3.1.4 Remodelação óssea

Aparentemente, os ossos são órgãos inertes, estáveis e não sujeitos às alterações estruturais, no entanto sabemos que, durante toda a vida, eles têm metabolismo ativo, sendo continuamente remodelados pela reestruturação de suas lâminas ósseas, de acordo com as forças de compressão e de tensão que atuam sobre eles. A matriz óssea é gradualmente degradada e repostada por osso novo em uma razão de substituição de 1mm/ano. (37)

O osso compacto é formado pela transformação do osso esponjoso. O diâmetro de um osso longo é aumentado pela destruição interna do osso (como explicado no processo de ossificação endocondral). Mesmo após terem atingido sua forma e seu tamanho adulto, o tecido ósseo antigo é continuamente destruído, e o tecido ósseo novo é formado em seu lugar. Todos esses eventos são dependentes de citocinas pró-inflamatórias, do fator de

crescimento transformador da superfamília beta e dos fatores angiogênicos (38). Assim, enquanto os osteoblastos produzem e mineralizam uma nova matriz óssea, os osteoclastos a reabsorvem.

As células precursoras de osteoclastos são normalmente liberadas como monócitos na corrente sanguínea. Em locais em que a superfície da matriz óssea encontra-se isenta da camada de osteoblastos, os monócitos se fundem para formar os osteoclastos multinucleados para a reabsorção óssea. Esses osteoclastos aderem-se à superfície da matriz óssea “livre” e iniciam sua degradação. (39)

À medida que o processo de remodelação se desenvolve, os osteoblastos depositam camadas concêntricas de matriz nova (matriz osteoide) que gradualmente preenchem a cavidade, deixando somente um canal estreito em torno de um novo vaso sanguíneo, o canal de Havers (39). As células que estão presentes na cavidade medular e que possuem a capacidade de se diferenciar em células da linhagem osteogênica são diferenciadas em células osteoprogenitoras. Após o início da reabsorção óssea pelos osteoclastos, vários hormônios como PTH, vitamina D3 e citocinas, como os IGFs, são capturados pela matriz regulando o metabolismo, a função e a regeneração óssea, resultando na diferenciação das osteoprogenitoras em osteoblastos maduros. (40)

O processo de remodelação óssea é importante para o crescimento, o reparo e a manutenção da saúde óssea. O armazenamento e a liberação de cálcio são dependentes do processo de remodelação, e seus níveis estão intimamente relacionados com o sutil controle das células envolvidas nesse processo. Os ossos também armazenam mais fosfato (fósforo) do que qualquer outro órgão. Níveis apropriados de fosfato são requeridos para a produção de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e ATP (molécula energética das células), assim a retirada de cálcio e de fósforo dos ossos para o sangue é controlada pelo PTH. Este interfere no número e no comportamento dos osteoclastos e na função renal de reabsorção de cálcio. Quando seus níveis estão muito elevados no sangue, a glândula tireoide produz calcitonina, que inibe a atividade osteoclástica e estimula os osteoblastos a secretarem e mineralizarem mais matriz óssea nova. A liberação da calcitonina pode ser influenciada pelo aumento do estresse mecânico, como a tração dos músculos esqueléticos para a sustentação do corpo, para a realização exercícios físicos e para a força da gravidade. (25)

Diante do que foi visto, pode-se afirmar que os ossos são dotados de uma capacidade notável para adaptar sua estrutura em resposta a variações de longa duração na carga imposta a eles. Este comportamento de adaptação sugere que a deposição e a erosão da matriz sejam controladas de alguma maneira pela solicitação mecânica local, mas os mecanismos envolvidos não são totalmente compreendidos (39). De acordo com seus estudos, Landis e Silver (41) sugerem que a formação mineral é mediada por uma combinação de efeitos biológicos, físico-químicos e biomecânicos no tecido.

Dessa forma, tem-se estudado cada vez mais técnicas e materiais que auxiliam no reparo de grandes defeitos ósseos. Atualmente, diversos materiais e técnicas têm sido utilizados com o intuito de aumentar e acelerar a neoformação óssea.

3.2 Laserterapia de baixa intensidade

No intuito de auxiliar o reparo ósseo, novas alternativas de terapêuticas vêm sendo estudadas. Uma delas é a laserterapia, em que a fonte de luz é o laser (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação), que se diferencia das fontes de luz convencionais pelo fato de possuir um único comprimento de onda, o que lhe permite uma propagação de forma coerente no espaço, carregando boas quantidades de energia de forma colimada e direcional (42). Para a utilização correta dessa forma de energia, a compreensão de alguns parâmetros físicos se faz necessária. O primeiro deles é a quantidade de energia, medida em joules (J) e entregue por uma fonte luminosa, que é diretamente proporcional à potência do aparelho que a emite (medida em watts [W]), e o tempo de exposição do tecido à mesma (medido em segundos). (43)

Com o aumento da disponibilidade de lasers no início dos anos 1970, tornou-se possível investigar seu uso como modalidade de reparo para diferentes tecidos conjuntivos (44). Vários tipos de lasers com diferentes comprimentos de onda, incluindo hélio-neônio (632.8 nm), arseneto de alumínio e gálio (805 ± 25 nm) e arseneto de gálio (904 nm) foram utilizados em diferentes doses e tratamentos (45). O uso do arseneto de alumínio e gálio (GaAlAs) – igualmente conhecido como laser de diodo, utilizado no presente estudo, é classificado como de baixa potência ou de baixa intensidade e tem sido utilizado cada vez mais na odontologia.

Os efeitos fisiológicos dos lasers de baixa potência ocorrem a nível celular (46) e podem estimular ou inibir atividades de proliferação bioquímica e fisiológica, alterando a

comunicação intercelular (47). Dessa forma, a atuação no metabolismo celular resulta em um aumento das funções nos tecidos lesionados e irradiados. (47)

Essa alteração ocorre devido à absorção dos fótons pelo complexo IV, situado na membrana interna das mitocôndrias, o que aumenta a produção de adenosina trifosfato e, conseqüentemente, a funcionalidade celular (48-50). No tecido ósseo, a aplicação do laser induz ao reparo ósseo pela ativação dos osteoblastos, levando à proliferação e à diferenciação destas células com conseqüente neoformação da matriz óssea (51). A neoformação óssea foi observada em diferentes estudos independente do procedimento cirúrgico realizado (47), no entanto, a maior parte das pesquisas foi realizada considerando a extração dentária (47). Especialmente nesse tipo de intervenção, observa-se, ao longo do tempo, que o osso trabecular formado se torna mais compacto, assumindo um padrão lamelar concêntrico, o que sugere um tecido ósseo maduro, enquanto o local cirúrgico não irradiado apresenta osso trabecular imaturo, com grandes espaços de medula óssea. (48)

O uso da LBI também foi avaliado quando aplicado após instalação de implantes para acelerar a osseointegração (52), bem como para a cicatrização de tecidos moles (53) com resultados satisfatórios. Vale ressaltar que as características histológicas mencionadas nos estudos acima foram relatadas ao usar laser de baixa intensidade – o GaAlAs.

Em relação à última década, vários estudos avaliaram os efeitos da LBI na neoformação óssea (22, 54), devido ao aumento da atividade osteoblástica (55), da vascularização (22) e da organização de fibras de colágeno (56). Estudos *in vitro* têm demonstrado que esse tipo de laserterapia exerce efeito bioestimulador em células osteogênicas e em tecidos ósseos (57, 58). Da mesma forma, estudos *in vivo* revelaram que o uso do laser de baixa intensidade aumenta o reparo ósseo em defeitos ósseos padronizados, além de melhorar a neoformação óssea em fraturas artificiais (59, 60). Adicionado a estes resultados, foram observados a indução na atividade da fosfatase alcalina e o aumento da expressão gênica da osteocalcina quando houve aplicação do laser de diodo, o que contribui para a formação óssea (61, 62). Embora tenha se observado a ação da laserterapia a nível celular, na literatura existem resultados controversos quanto ao uso da LBI e seus efeitos nas atividades celulares (63). No entanto, há estudos em que a laserterapia promoveu a proliferação e a diferenciação de osteoblastos (51), e a inibição a diferenciação de osteoclastos (64), além de induzir o processo de mineralização (65). Ainda assim há alguns estudos que afirmam que as etapas de proliferação e de crescimento celular

podem permanecer inalteradas quando expostas a diferentes doses de irradiação, o que pode ser observado em diferentes tipos celulares, como osteoblastos e fibroblastos (66). A combinação específica entre comprimento de onda e dose aplicada pode influenciar nas diferentes respostas para cada tipo celular. (67)

Considerando a variedade de protocolos utilizados com uso do laser (Tabela 1) para diferentes tipos de células e de estudo, é necessária, portanto, uma investigação dos parâmetros bioestimuladores e dos efeitos reais da LBI. Nesse sentido, tem sido aceito que esse tipo de laserterapia produz melhores resultados quando administrado em doses baixas do que a doses altas (68). Além disso, doses acima de 20 J/cm² foram relatadas por possuírem ação inibitória (69, 70), o que é controverso na literatura.

O estudo de Altan et al., (71) igualmente verificou que a laserterapia de baixa intensidade, com doses de 5 e 6.300 J/cm², era significativamente eficaz, enquanto a dose de 20 J/cm² não mostrou efeito significativo no aumento da formação óssea. Entretanto, Saito e Shimizu (72) utilizaram doses elevadas de 6.354 e 21.180 J/cm² e obtiveram resultados positivos, revelando um estímulo dose-dependente da formação óssea via laserterapia. Em outro estudo, Silva et al. usaram dose de 160 J/cm² e similarmente alcançaram resultados significativos (73). Estes resultados revelam que a eficiência da laserterapia é alterada de acordo com a dose aplicada, o que já havia sido observado nos estudos de Gross e Jelkmann (74) e Sattayut et al., (75), os quais demonstraram que a dose muito baixa da LBI não apresenta efeito, a dose muito alta pode resultar em pouco ou nenhum efeito, enquanto que a dosagem extrema pode levar à inibição dos efeitos produzidos pelo laser.

Estes resultados confirmam o que Khadra et al. (22) observaram em 2004, quando foi utilizada a LBI (laser de diodo GaAlAs, 830 nm, 23 J/cm²) em defeitos ósseos criados em calvárias de ratos para avaliar o seu efeito sobre o reparo e o crescimento ósseo. No experimento, os animais foram mortos em dois tempos (14 e 28 dias). Em ambos os tempos de morte, as amostras de tecido que receberam a LBI continham significativamente mais cálcio e fósforo após 14 dias ($p = .002$ e $p = .006$, respectivamente) e após 28 dias ($p = .002$ e $p = 0.039$) do que nos grupos em que não foi aplicado o laser, assim como o teor relativo de proteínas foi maior no grupo irradiado após 14 e 28 dias ($p = 0.013$ e $p = 0.015$, respectivamente). As análises histológicas revelaram angiogênese e formação de tecido conjuntivo mais pronunciadas nos grupos irradiados após 14 dias ($p = 0.01$ e $p = 0.04$,

respectivamente), mas não após 28 dias. A formação óssea foi maior no grupo experimental ($p = 0.008$ e $p = 0.002$) do que nos demais grupos nos dois tempos de morte. (22)

É possível observar a falta de padronização dos parâmetros da LBI nos diferentes estudos, o que, muitas vezes, justifica os diferentes resultados encontrados. Além dos parâmetros do laser, é importante considerar outros cofatores que igualmente podem afetar a dose administrada, como a profundidade do tecido-alvo. Este é um cofator importante, pois a quantidade de energia diminui à medida que a profundidade do tecido aumenta. Esse foi um dos motivos que impulsionaram a utilização do comprimento de onda no espectro infravermelho. Devido à sua boa penetração de luz, há uma menor perda de eficiência comparado aos outros lasers, podendo atingir até 37% de sua intensidade após uma profundidade de 2 mm. (45)

Tabela 1 – Protocolos de LBI

Autor	Dose (J ou J/cm²)	Comprimento de onda
AboElsaad, 2009	16 J/cm ²	830 nm
Nascimento et al., 2010	20J/cm ²	830 nm
Pires-Oliveira et al., 2010	50J/cm ²	904 nm
Pinheiro et al., 2010	4 J/cm ²	850 nm
Fávaro-Pípi et al., 2010	0.51J(50J/cm ²)	830nm
Coelho et al., 2014	4 J/cm ²	830 nm
Batista et al., 2014	6J (210 J/cm ²)	830nm
Eslamian et al., 2014	2 J/cm ²	810 nm

Fonte: O autor (2019)

Embora ainda não haja uma padronização nos protocolos da LBI, o conceito e o mecanismo de bioestimulação de feridas por este tipo de terapia têm atraído considerável atenção. Estudos de uma revisão sistemática sobre o uso de lasers em cirurgia oral avaliando reparo ósseo mostraram que a LBI é indicada para melhorar a neoformação e a mineralização óssea (47). Entretanto, os parâmetros aplicados nesses estudos variaram na potência e no tempo de irradiação (76, 48, 77, 78, 79). Mesmo com diferentes protocolos, alguns dos estudos concordaram que a LBI estimula a biomodulação da neoformação óssea por meio da osteogênese, diminuindo o tempo de reparo do tecido ósseo. (76, 48, 79)

O reparo ósseo é um complexo processo biológico que requer etapas específicas para neoformação envolvendo mudanças nas diferenciações celulares. O restabelecimento

da arquitetura e da funcionalidade óssea depende, principalmente, da correta proliferação celular e da deposição de íons de cálcio para determinar o sucesso da regeneração do tecido lesionado. O tecido ósseo tem ampla capacidade de se regenerar, no entanto, existem limites para o reparo espontâneo. Em caso de defeitos críticos, nos quais a capacidade de vascularização é prejudicada ou há instabilidade mecânica, a capacidade de recuperar a estrutura e a função é limitada. Nesse contexto, entra a importância da ROG, em que se utilizam técnicas para viabilizar e acelerar a neoformação óssea, como, por exemplo, o uso de membranas biocompatíveis e de técnicas de enxertia utilizando substitutos ósseos. A laserterapia tem sido cada vez mais associada a essas técnicas no intuito de se obter uma boa qualidade óssea. Nesse sentido, estudos experimentais têm sido realizados em modelo animal para comprovar os efeitos da LBI na neoformação óssea.

Nessa perspectiva, avaliando a LBI associada a substitutos ósseos, o estudo de Pinheiro et al., (80) investigou os efeitos da laserterapia (830nm e 4J/cm²) associada ao enxerto ósseo Genox®, em defeitos ósseos criados no fêmur de ratos Wistar, em que foi possível observar que, no grupo irradiado, o reparo ósseo foi maior e foi caracterizado pelo aumento da neoformação óssea e da quantidade de fibras colágenas ao redor do enxerto a partir do 15º dia após cirurgia. Ainda avaliando a ação da LBI associada a substitutos ósseos, Rasouli et al., (81) observaram os efeitos da laserterapia (810 nm, 300 mW, 4 J/cm², GaAlAs) associada ao Bio-Oss® no processo de osteogênese em defeitos criados na calvária de coelhos. Neste estudo, em cada calvária foram feitos quatro defeitos de 8 mm de diâmetro na calvária de cada animal.

Um defeito ficou como controle com apenas coágulo sanguíneo, o segundo local foi preenchido com Bio-Oss®, o terceiro foi tratado com laser e o quarto local, por sua vez, com Bio-Oss® e laser. Neste estudo foi observado que a quantidade média de neoformação óssea na 4ª e 8ª semana foi de 15,83 e 18,5% no grupo controle; 27,66 e 25,16% no grupo irradiado por laser; 35,0 e 41,83% no grupo em que foi aplicado apenas Bio-Oss, e 41,83 e 47,0% nas amostras tratadas a laser + Bio-Oss com diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). Nos dois estudos citados, os autores concluíram que a aplicação da LBI em combinação com o material de enxerto pode promover o reparo ósseo, considerando também a capacidade osteocondutora do substituto ósseo utilizado, sendo evidente que o uso desse biomaterial dificulta a formação de fibrose e protege a cavidade. (82)

Em adição aos substitutos ósseos, a utilização de membranas de colágeno na ROG tem dificultado a migração epitelial para o defeito ósseo, o que comprometeria a qualidade óssea neoformada. Portanto, o uso destas membranas auxiliam na manutenção de um meio favorável para as células osteogênicas do hospedeiro se deslocarem para a área do defeito e acelerarem o reparo ósseo (83). A membrana deve ser biocompatível, capaz de criar espaço, obter integração tecidual e ser de fácil manuseio. A associação da membrana com o enxerto autógeno tem melhorado alguns resultados, uma vez que sua utilização estabiliza o material de enxerto dentro do defeito ósseo. Assim, a associação desses biomateriais com a laserterapia pode melhorar os resultados alcançados até então.

Avaliando essa associação, o estudo de Freitas et al., (23) traz uma análise sobre técnicas usadas na ROG associadas à laserterapia, em que foram utilizados 80 ratos Wistar, nos quais foram confeccionados um defeito ósseo crítico por calvária. Esses animais foram divididos em oito grupos: grupo C (controle – apenas coágulo sanguíneo); grupo M (membrana de colágeno – BioGide®); grupo terapia de fotobiomodulação (TFBM); grupo A (osso autógeno); grupo A + TFBM; grupo A + M; grupo TBMT + M; e grupo A + TFBM + M. Os animais foram mortos após 30 dias da cirurgia.

Nas análises histomorfométrica e estatísticas, observou-se que todos os grupos tiveram maior área de osso recém-formado em comparação ao grupo C ($9,96 \pm 4,49\%$). O grupo TFBM + M alcançou maior quantidade de osso neoformado ($64,09 \pm 7,62\%$), seguido pelos grupos TFBM ($47,67 \pm 8,66\%$), M ($47,43 \pm 15,73\%$), A + TFBM ($39,15 \pm 16,72\%$) e A + TFBM + M ($35,82 \pm 7,68\%$). Após o grupo C, os grupos A ($25,10 \pm 16,59\%$) e A + M ($22,72 \pm 13,83\%$) apresentaram as menores quantidades de osso recém-formado. Sendo assim, os autores concluíram que a utilização da TFBM pode ser eficaz para reparo ósseo, quando associado a técnicas de regeneração óssea.

Do mesmo modo, o estudo feito por Pomini et al., (84), em defeitos ósseos críticos na calvária de ratos, avaliou um sistema formado por xenoenxerto (Bio-Oss®) e membrana de fibrina (Tisseel Lyo®) associado à laserterapia. Trinta e seis ratos foram divididos em quatro grupos: CS (n = 8), defeito preenchido com coágulo sanguíneo; MFB (n = 10), preenchido com membrana de fibrina + xenoenxerto; CS^{TFBM} (n = 8), coágulo sanguíneo + fotobiomodulação; MFB^{TFBM} (n = 10), membrana de fibrina + xenoenxerto + fotobiomodulação. Os animais foram mortos após 14 e 42 dias. Na análise histológica e microtomográfica, neoformação óssea foi observada em todos os grupos, limitada às

margens do defeito e sem fechamento completo da ferida. No grupo MFB, houve aumento da formação óssea entre os períodos ($4,3 \pm 0,46$ a $6,01 \pm 0,32$), mas com menor densidade de volume quando comparado ao grupo MFB^{PBMT} ($5,6 \pm 0,45$ a $10,64 \pm 0,97$). Portanto, o sistema formado pelo xenoinxerto e pela membrana de fibrina associado ao protocolo de laserterapia tem efeito positivo no processo de reparo ósseo. (84)

Foram observados resultados favoráveis da LBI, quanto ao reparo ósseo, mesmo sem a utilização de substitutos ósseos ou de membranas de colágeno. Estudo em humanos observou neoformação óssea quando feito o uso da LBI ($\lambda = 630\text{--}660$ nm, 25 mW/cm², 6 min) em cirurgia de implantes dentários. A amostra do estudo constituiu de 20 pacientes submetidos a um levantamento de seio maxilar bilateral e à instalação simultânea de implantes dentários. Os pacientes foram submetidos a exames de imagem pré e pós-operatório (após o 1º, 3º e 6º mês). Desse modo, foi possível observar que o lado que recebeu a laserterapia apresentou melhores resultados do que o grupo controle. O aumento da densidade óssea em todos os intervalos pós-operatórios foi estatisticamente significante ($p < 0,05$). (85)

Embora haja resultados positivos quanto ao reparo ósseo utilizando a LBI isolada, os biomoduladores têm sido utilizados com o intuito de melhorar a osseointegração e a neoformação óssea em torno de implantes dentários e em perdas ósseas por outros fatores. Além das opções já citadas, vem crescendo na odontologia o uso de produtos derivados do sangue, os concentrados plaquetários (CP). Muito embora já tenham sido provados os efeitos benéficos dessa terapia sobre o processo de reparo ósseo, assim como os da LBI, a associação entre essas duas técnicas ainda foi pouco investigada, carecendo de estudos acerca de tal tópico.

O estudo de Jonasson et al. (86) avaliou a eficácia da associação da LBI (780 nm e 7.5 J/cm²) com CP no reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos Wistar. Os animais foram randomizados em quatro grupos: LP (LBI + CP); CP; L (LBI) e C (controle, apenas enxerto autógeno – osso removido da calvária que foi triturado). Os animais foram mortos após 30 e 60 dias da cirurgia. Os espécimes foram submetidos a análises radiográficas (digitais e convencionais), histológicas, histomorfométricas e imuno-histoquímicas. A análise histológica demonstrou uma diferença significativa quanto à formação de osso imaturo entre os animais do grupo L ($p < 0,049$) após 60 dias quando comparado aos demais grupos. Taxas mais altas de infiltrados inflamatórios e de fibrose

foram observadas nos grupos LP e CP após 30 e 60 dias. Não foi detectado aumento significativo na densidade óssea nos animais que receberam CP. Os grupos L e C apresentaram escores mais altos de imunocoloração positiva para osteocalcina na matriz óssea e extracelular.

Como conclusão, o estudo afirma que a LBI reduz a inflamação e contribui para o aumento da formação óssea, e que o tratamento com CP mostrou manter o tecido conjuntivo e induzir fibrose durante o reparo ósseo.

2.3 Concentrados plaquetários

Com o advento da implantodontia, muito tem sido discutido sobre o uso de vários substitutos ósseos destinados a criarem condições ósseas necessárias para permitir a reabilitação com implantes dentários. Diferentes fatores de crescimento e proteínas estão sendo cada vez mais utilizados sozinhos ou em conjunto com materiais de enxerto ósseo em terapêuticas médicas e odontológicas, especialmente na implantodontia e periodontia com a finalidade de aumentar e de acelerar a regeneração óssea. Entre estes fatores estão os concentrados plaquetários, o plasma rico em plaquetas (PRP) e a fibrina rica em plaquetas (PRF). (87)

Os concentrados plaquetários foram originalmente utilizados para o tratamento e a prevenção de hemorragia causada pela trombocitopenia severa, e o produto formado e utilizado para transfusão foi denominado de PRP (88). Em seguida, o uso de produtos derivados do sangue para selar feridas e estimular a cicatrização começou com o uso de colas de fibrina, que são constituídas de fibrinogênio concentrado (polimerização induzida por trombina e cálcio) (89). A cola autóloga de fibrina é uma das opções mais seguras, mas a sua obtenção é complexa e cara (90). Desde então, os benefícios trazidos pelos produtos sanguíneos foram cada vez mais estudados, e novos protocolos, kits e centrífugas foram desenvolvidas para contornar as dificuldades encontradas.

Nesse contexto, foi desenvolvida por Choukroun et al. (13) a fibrina rica em leucócitos e plaquetas como um adjuvante terapêutico para melhorar a cicatrização de feridas e a regeneração de tecidos após procedimentos cirúrgicos intraorais. A PRF é considerada como concentrado plaquetário de segunda geração caracterizado por um método de obtenção simples, sem manipulação bioquímica ou aditivos exógenos à amostra de sangue (91). Para sua obtenção, o sangue venoso é colhido e centrifugado em tubos de

vidro ou de plástico com jateamento (12) de sílica sem anticoagulantes, resultando em três camadas distintas: corpúsculos vermelhos no fundo devido à densidade das hemácias, uma camada intermediária que representa o coágulo de PRF, em que se encontra grande quantidade de plaquetas e leucócitos (12) e o plasma pobre em plaquetas ou acelular no topo do tubo.

A membrana de PRF é composta por uma estrutura tridimensional e densa, que permite o aprisionamento de plaquetas e de leucócitos. Estes, por sua vez, não liberam citocinas e fatores de crescimento, desempenhando um papel crucial no processo de cicatrização (91, 12). Os neutrófilos e macrófagos eliminam bactérias e tecidos necrosados através da fagocitose, debridando a ferida e prevenindo infecções secundárias. Por outro lado, as plaquetas e os macrófagos secretam fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento beta 1 (TGF- β 1), fator de crescimento derivado de plaquetas (FGDP), fator de crescimento endotelial vascular (FGEV) e fator de crescimento semelhante à insulina (FGI), que contribuem para a cicatrização de feridas através do estímulo da reepitelização, da angiogênese e da formação da matriz extracelular. (92)

Quando comparado a outros concentrados plaquetários, foi observado que a PRF libera níveis mais altos de fatores de crescimento em um período de (12) em 10 dias. Além de liberar proteínas bioativas, a rede de fibrina rica em plaquetas também funciona como suporte para migração celular (16) e se degrada gradualmente. (93)

Corroborando com os resultados anteriores, Lourenço et al., (2018) observaram alta liberação de fatores de crescimento (PDGF, bFGF e VEGF) nas primeiras 24 horas, reduzindo ao decorrer do tempo, mantendo concentrações significativas após três semanas. Ambas citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4, e IL-1-RA) e pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IFN-gama) apresentaram picos de liberação diferentes, mantendo altas taxas de fracionamento por até 21 dias, bem como quimiocinas de relevância no reparo tecidual também foram produzidas em grandes quantidades ao longo do período experimental.

Desse modo, estes resultados demonstram que a membrana de fibrina derivada do sangue possui alta estabilidade estrutural e conteúdo celular, assim como estudos de diferentes áreas *in vitro* e em animais comprovaram que a PRF melhora a cicatrização de tecidos moles, promovendo a angiogênese e a proliferação celular. (94)

Além de sua ação benéfica sobre os tecidos moles, a aplicação da PRF igualmente tem sido associada a resultados positivos no reparo e na regeneração do tecido ósseo. Quando comparada a uma membrana de colágeno de origem suína amplamente utilizada, a PRF pareceu produzir resultados superiores em termos de proliferação de osteoblastos e de células periosteais *in vitro* (95, 96). Além disso, a PRF tem sido empregada para reduzir a inflamação pós-operatória (97, 98), a dor relatada pelo paciente (99) e a frequência de alveolite (100, 101) após a extração de terceiros molares. A capacidade de cicatrização desse concentrado plaquetário também foi estudada em regeneração periodontal e em cirurgia plástica.

Diante destes benefícios relatados, estudos pré-clínicos *in vitro* utilizaram a PRF em uma infinidade de indicações de cirurgia periodontal e oral. Uma metanálise recente mostrou uma diferença de redução de profundidade de sondagem de 1,1 mm, ganho de inserção clínica de 1,2 mm e ganho ósseo de 1,7 mm em defeitos intraósseos em favor do debridamento com retalho aberto e uso da PRF quando comparado ao desbridamento sem o do concentrado plaquetário (10). A PRF também tem sido amplamente utilizada em procedimentos da implantodontia, no intuito de melhorar e acelerar a cicatrização dos tecidos, sendo usada como coágulo, ou associada a enxerto ósseo, ou utilizada como uma membrana.

De fato, uma das primeiras aplicações da PRF na odontologia foi na implantodontia (102). No entanto, resultados variáveis foram relatados quanto aos seus benefícios sobre o uso associado a implantes dentários e à sua utilização em defeitos ósseos. Enquanto que alguns estudos demonstram que a adição da PRF nos procedimentos de aumento do seio maxilar acelera a formação óssea e reduz a reabsorção óssea alveolar (102, 103), outros não relataram ganhos em aplicações similares (104, 105). Seguindo o uso da PRF em levantamento de seio maxilar, Bosshardt et al., (106) e Gassling et al., (96) avaliaram os resultados histomorfométricos após o uso de membranas de PRF em comparação com uma membrana de colágeno absorvível (Bio-Gide; Geistlich, Wolhusen, Suíça) para cobrir a janela lateral que deu acesso ao seio maxilar. E ambos os estudos não relataram diferença na proporção de formação óssea vital e de material de enxerto residual após 5 a 11 meses, o que, sem dúvidas, é um resultado positivo para implantodontia, pois a membrana de PRF tem custo inferior quando comparada à membrana de colágeno comercial.

Quanto à preservação da crista alveolar, estudos compararam a perda óssea horizontal (POH) e a perda óssea vertical (POV) em cavidades pós-extração, tratadas com PRF ou com apenas o coágulo sanguíneo (103, 107, 108) e Temmerman et al. (103) relataram (POH) de $0,8 \pm 2,5$ mm na face (V) e $0,6 \pm 2,2$ mm na face lingual (L) a 1 mm abaixo da crista para os alvéolos tratados com PRF, o que representou uma redução total da largura (RTL) de $22,84 \pm 24,28\%$ (103). Os resultados observados foram significativamente inferiores quando comparados ao grupo controle (POH / V: $2,9 \pm 2,7$ mm; POH / L: $2,1 \pm 2,5$ mm; RTL: $51,92 \pm 40,31\%$). Em estudo com o mesmo objetivo, foi relatado que após 8 semanas da extração houve uma redução média da largura da crista alveolar de 0,06 mm para os alvéolos tratados com PRF, que foi significativamente menor que a redução de 0,43 mm observada nos alvéolos em que o reparo ocorreu de forma espontânea. Moussa et al., (109) estudaram os efeitos do recobrimento de blocos de enxertos autógenos com a membrana de PRF, em que puderam observar uma maior reabsorção do enxerto ósseo na ausência da membrana de LPRF ($0,8 \pm 0,6$ mm vs. $1,6 \pm 0,9$ mm) após 4 meses.

O concentrado plaquetário de segunda geração tem sido utilizado de forma isolada ou associado a outras terapias, como os substitutos ósseos, no intuito de ser um complemento útil para a neoformação óssea. Com este objetivo, Abdullah (110) comparou a regeneração óssea em defeitos ósseos não críticos em calvária de ratos, preenchidos com PRF isolada ou associada com β -TCP. Os animais foram divididos em três grupos, a saber: grupo I: defeitos preenchidos com PRF isolada, grupo II: PRF + β -TCP e o grupo III: controle, em que houve o reparo espontâneo. Os animais foram mortos após 1, 2, 3, 4 e 6 semanas após cirurgias.

Através da tomografia microcomputadorizada (TMC), a neoformação óssea e a densidade óssea mineral foram avaliadas. Foi observada maior regeneração óssea nos defeitos que receberam PRF com β -TCP em comparação aos defeitos que receberam PRF isoladamente nas primeiras 2 (duas) semanas ($P < 0,001$). No entanto, as diferenças no volume e na densidade do osso recém-formado entre os grupos PRF e PRF / β -TCP não foram significativas nas 3, 4 e 6 semanas pós-operatórias ($P > 0,005$), concluindo que a associação da PRF ao β -TCP melhorou significativamente a regeneração óssea nas primeiras 2 (duas) semanas após a cirurgia. Embora as diferenças entre os resultados com e sem a adição de PRF ao β -TCP sejam estatisticamente insignificantes na 3ª e 6ª semana, foi, no entanto, evidente que o grupo que recebeu a combinação apresentou melhores resultados, sugerindo assim um mecanismo sinérgico para esse efeito.

Buscando ainda promover pesquisas em relação à reabilitação óssea, Karayürek et al., (111) se basearam na hipótese de que o uso da PRF com materiais de enxerto ósseo poderia aumentar a regeneração. Através de defeitos ósseos criados na calota de coelhos, avaliaram os aspectos histopatológicos e imuno-histoquímicos após a aplicação da PRF com enxerto autógeno, xenoenxerto e β -TCP. Os animais foram divididos em grupo I: o defeito da direita foi deixado apenas com coágulo sanguíneo e o da esquerda foi tratado com PRF; grupo II: enxerto ósseo autógeno (bloco removido da calvária) foi aplicado no defeito direito; e no defeito esquerdo, foi utilizado PRF + enxerto autógeno; grupo III: apenas xenoenxerto (Bio-oss®, Geistlich, Suíça) foi aplicado no defeito direito e, para o defeito esquerdo, PRF + xenoenxerto em volumes iguais.

Por fim, no grupo IV, o β -TCP (R.T.R. syringe, Septodont, USA) foi aplicado ao defeito direito e, para o defeito esquerdo, PRF + β -TCP foram misturados em volumes iguais (112). Os resultados histopatológicos foram melhores para o grupo que utilizou enxerto autógeno. Como resultado, o estudo traz que, em termos de neoformação óssea, o enxerto autógeno associado à PRF produziu resultados superiores, mas a combinação de β -TCP-PRF não teve diferença quando comparado ao grupo tratado apenas com β -TCP. No entanto, mais estudos experimentais e clínicos podem ser benéficos para esclarecer o mecanismo exato e os resultados da combinação da PRF com enxertos ósseos no processo de cicatrização óssea.

Outra aplicação de bioestimulação é a irradiação direta sem afetar a temperatura da superfície pelo laser de baixa intensidade ou laser de diodo (81). A LBI tem sido aplicada na indução da regeneração, de forma a aumentar as atividades das células ósseas, sendo um coadjuvante nesse processo. Tem sido proposto que a LBI estimula a cicatrização de feridas (113) e a síntese de colágeno (114). Sendo assim, associar essa técnica não invasiva ao uso de concentrados plaquetários pode ser uma forma de terapia combinada que só vem acrescentar no processo de reparo ósseo, já que ambas as técnicas mostram efeitos e propriedades favoráveis ao processo de neoformação óssea.

Com essa linha de pensamento, em desenho de ensaio clínico randomizado realizado em nove pacientes com perda bilateral dos dentes posteriores da mandíbula, Sleem et al., (115) utilizaram tratamento com implantes dentários associado com PRF nos dois lados da mandíbula em todos os pacientes. A aplicação do laser foi realizada para um lado duas vezes por semana, durante um mês a partir do dia da instalação. A dor pós-

operatória foi avaliada diariamente durante a primeira semana usando a escala de classificação numérica da dor (NRS) como desfecho primário. A densidade óssea relativa à área peri-implantar foi medida por radiografia digital intraoral, e a estabilidade dos implantes foi avaliada por radiofrequência, ambas, imediatamente após a instalação e no pós-operatório de 1, 4 e 9 meses.

Como resultado, o NRS para dor diminuiu significativamente no final da primeira semana do pós-operatório nos dois grupos, com uma média de $(2,22 \pm 1,56)$ $(2,11 \pm 1,83)$, respectivamente. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos teste ($p = 0,892$). Os valores relativos da densidade óssea diminuíram no final do nono mês de acompanhamento no grupo experimental e no controle, com uma média de $(134,42 \pm 16,13)$ $(128,77 \pm 33,54)$, respectivamente. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos teste ($p = 0,863$). Os valores de radiofrequência para a estabilidade do implante não mostraram diferença significativa após nove meses de acompanhamento, quando comparados aos valores de estabilidade inicial no dia da instalação dos implantes no grupo experimental e no controle com os valores médios de $(67,24 \pm 1,79)$ e $(66,9 \pm 2,57)$, respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos teste ($p = 0,793$). Os autores concluíram que não há diferenças estatisticamente significativas nos valores de dor pós-operatória, de estabilidade do implante e de densidade óssea entre os sítios onde os implantes foram instalados e tratados com PRF e incrementados com o laser de diodo em comparação com os sítios dos implantes tratados apenas com PRF.

A lógica científica subjacente aos protocolos de obtenção da PRF é que as plaquetas são um reservatório de fatores de crescimento que desempenham papéis cruciais nos mecanismos de reparo de tecidos duros e moles (5, 116). A obtenção do coágulo de fibrina e de ativação plaquetária são induzidas pela cascata de coagulação que ocorre durante a centrifugação. Durante o processo de coagulação, a trombina endógena reage com o fibrinogênio para formar o coágulo de fibrina, de modo que o soro sobrenadante obtido após a centrifugação não é mais capaz de coagular. Muitas tentativas recentes foram feitas para otimizar protocolos para a aplicação clínica da PRF. Entre eles, a *Advanced-PRF* (A-PRF) foi desenvolvida usando velocidades mais lentas e menor tempo de centrifugação (1400 rpm ou 200 g por 8 min) (117). Esta técnica permite a comparação do A-PRF com a PRF convencional sobre os efeitos da força centrífuga (velocidade e tempo) na formação óssea alveolar, o que é relevante para regeneração tecidual. (118)

No intuito de elucidar o efeito da A-PRF na formação óssea, Masahiro et al., (119) utilizaram coágulos de A-PRF nos alvéolos de pré-molares após exodontias em cães da raça Beagle. A neoformação óssea foi avaliada através de exames histológicos e de imunofluorescência, após 14 e 30 dias das cirurgias. O exame histológico revelou osso recém-formado, preenchendo até o centro das cavidades no grupo A-PRF após 14 dias, enquanto que, após 30 dias, foi observada trabécula do osso denso e regular dispostos em osso poroso. Expressões mais elevadas de osteocalcina e osteopontina foram observadas no osso recém-formado no grupo A-PRF, em comparação ao grupo controle. Da mesma forma ocorreu quanto às taxas de formação óssea, em que o grupo A-PRF teve maior formação óssea após 14 dias ($67,77 \pm 12,10$) e 30 dias ($79,90 \pm 2,22$) do que o grupo controle após 14 dias ($28,22 \pm 2,16$) e após 30 dias ($52,28 \pm 4,09$).

Os autores concluíram, deste modo, que a aplicação da A-PRF pode resultar em nova formação óssea e acelerar o reparo ósseo. Além destes resultados, o grupo A-PRF aumentou a atividade osteoblástica podendo, assim, ser útil para a formação óssea na área da odontologia e da medicina.

Em conclusão, diante das informações apresentadas, podemos afirmar que, embora a PRF pertença a uma nova geração de concentrados plaquetários, sem dúvidas possui a estrutura de uma fibrina. Fato este que é suficiente para explicar a capacidade cicatricial da PRF. Além disso, a sua polimerização lenta confere à membrana de PRF um efeito particularmente favorável à arquitetura fisiológica para apoiar o processo de cicatrização.

No entanto, é necessário investigar ainda mais as características plaquetárias e inflamatórias desse biomaterial. Uma completa compreensão de sua fisiologia e seu significado permitirá uma melhor compreensão dos resultados clínicos obtidos e, posteriormente, estender os possíveis campos de aplicação dessa terapêutica e seus protocolos.

4 METODOLOGIA

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo: 5541150219) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), da Universidade Federal da Bahia (UFBA). As cirurgias foram realizadas no biotério de experimentação do laboratório de neuroimunoendocrinologia e toxicologia do ICS/UFBA, seguindo as normas éticas no uso de animais de laboratório, estabelecidas pela legislação atual e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.1 Amostra

Foi utilizado o Programa Estatístico WinPep para calcular o 'n' amostral. O critério utilizado para o cálculo da amostra foi baseado em estudos com protocolos semelhantes empregando-se a membrana de PRF (120) para comparar duas proporções de neoformação óssea, usando os seguintes valores de referência: nível de significância de 5%, poder de 95% e proporção mínima esperada entre os grupos de 0,05. Seguindo esses parâmetros, assumiu-se um 'n' mínimo de 6 ratos para cada grupo experimental. Será necessária a utilização de 12 ratos doadores para obtenção de membranas de PRF, a serem aplicadas como enxerto em 24 defeitos ósseos. Cada membrana obtida de um (01) rato doador foi dividida em duas, cada metade foi dobrada e utilizada em um defeito ósseo criado. Além disso, foram calculados 10% do "n" amostral do total de grupos (05 ratos).

Sendo assim, utilizaram-se 65 ratos Wistar (250 a 350 g), provenientes do biotério SUPRILAB. Eles foram divididos em quatro grupos de doze animais. Seis animais de cada grupo experimental foram eutanasiados após 30 e 60 dias. Os grupos experimentais eram os seguintes: C (controle), PRF (PRF), L (laserterapia), PRFL (PRF + laserterapia).

Os animais foram mantidos em condições padrão para a espécie no biotério de experimentação do laboratório de neuroimunoendocrinologia e toxicologia, em caixas de polipropileno nas medidas de 41x34x16, para a capacidade de 3/4 animais, fechadas com tampa de arame de aço carbono, com encaixe para bebedouros. Durante o período experimental, os animais foram alimentados com ração comercial para roedores e hidratados com água *ad libitum*.

As caixas foram mantidas em estantes de aço em sala climatizada (temperatura de 22 °C +/- 2 °C), com exaustão, condições de umidade (65%) e de luminosidade controladas de 12/12 horas. As gaiolas foram mantidas limpas e lavadas com água e sabão neutro, a

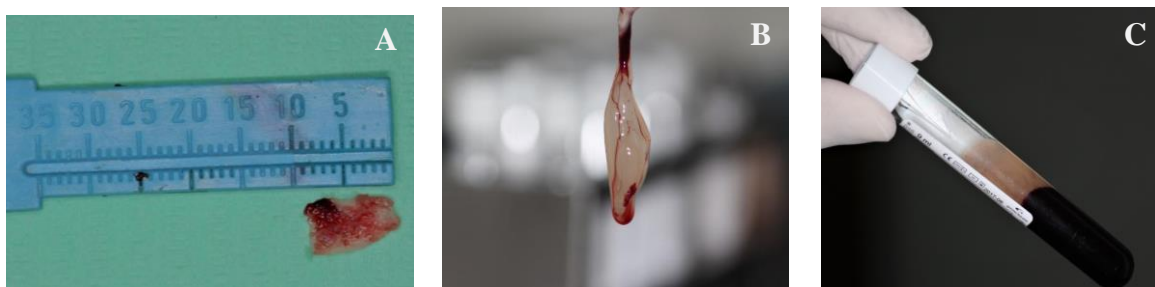
cada dois dias, quando a maravalha era trocada. Foram agrupados aleatoriamente 03 ratos por caixa, separados de acordo com o grupo experimental.

4.2 Preparo da membrana de PRF

Através da punção intracárdica, com scalp a vácuo, diretamente no ventrículo esquerdo do animal foram coletados de 05 a 08 ml de sangue de cada rato doador, com peso corporal de aproximadamente 350 g. As amostras de sangue foram coletadas em um tubo plástico da tampa branca, sem tratamento de sílica, com ausência de anticoagulantes e imediatamente centrifugadas (Montserrat Modelo 80-2B15 mL) com 2400 rpm por 10 minutos. Sabendo que aproximadamente 12% das plaquetas são perdidas na fração de sangue utilizando o tubo de vidro para centrifugação e, portanto, dificultando que o processo de concentração plaquetária ocorra na camada do plasma, o tubo de plástico sem jateamento interno foi recomendado para evitar a cascata de coagulação precoce no tubo e impedir a rápida coagulação do sangue antes da centrifugação (121).

Após a centrifugação, foi possível obter o coágulo de PRF acima dos eritrócitos, localizado na porção média do tubo (Figura 1a). Em seguida, o coágulo (Figura 1b) foi removido cuidadosamente, pressionado entre duas compressas estéreis para obter uma membrana de fibrina autóloga (Figura 1c). Cada membrana, obtida de um rato doador, foi dividida em duas, e cada metade obtida foi dobrada ao meio para utilização em um defeito ósseo criado (como indicado no tópico 4.3).

Figura 1 – (a) Coágulo de PRF. (b) Coágulo removido. (c) Membrana de fibrina.

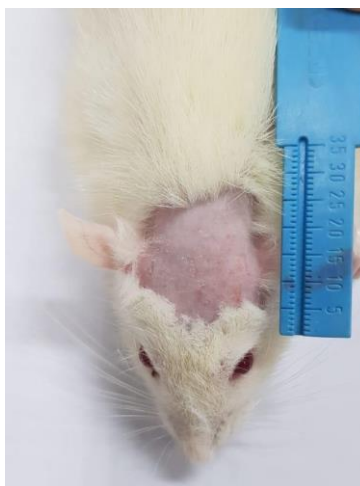


Fonte: O autor (2019)

4.3 Procedimento cirúrgico

Após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com ketamina a 10% (100mg/kg) + xilazina a 2% (14mg/kg), i.p. Em seguida, os animais eram posicionados em decúbito ventral, sobre campo cirúrgico, para então realizar a tricotomia (Figura 2) na região da calvária e a antissepsia da área cirúrgica com álcool iodado.

Figura 2 – Tricotomia prévia ao procedimento cirúrgico



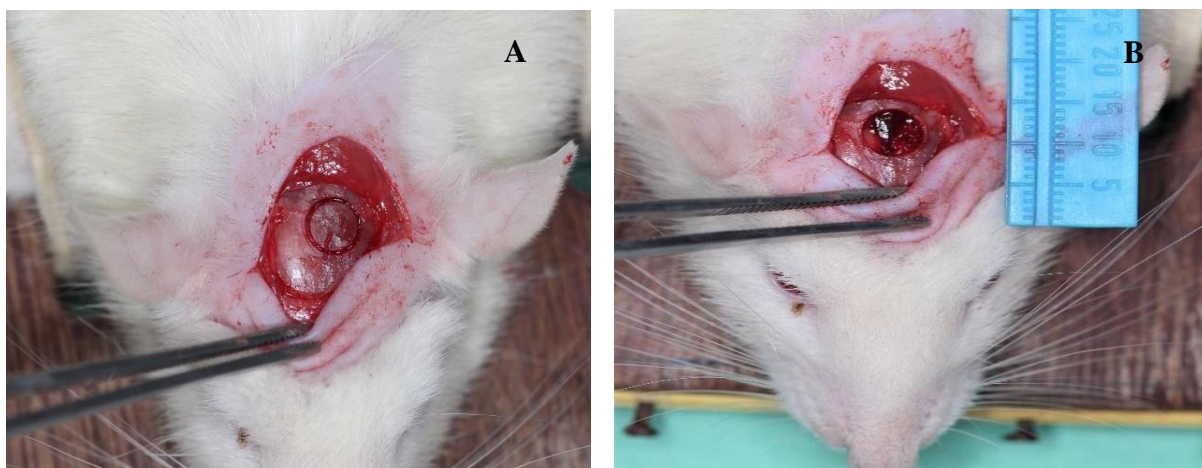
Fonte: O autor (2019)

Foi realizada incisão semilunar entre as orelhas no intuito de dificultar o acesso posterior da ferida cirúrgica pelos animais. A incisão cutânea e muscular foi feita com aproximadamente 3 cm de extensão para a exposição do tecido ósseo, utilizando cabo de bisturi n° 3 com lâmina n° 15C. Os tecidos subcutâneo e muscular foram então divulsionados. Em seguida, o periósteo foi incisado e afastado. A visualização do campo operatório foi mantida por meio de três pinças hemostáticas.

Enquanto as amostras de sangue estavam sendo centrifugadas, um defeito ósseo foi confeccionado na porção mediana da calota craniana de cada rato, entre os ossos parietais, com aproximadamente 07 mm de diâmetro (Figura 3a), por meio de uma broca trefina de 06 mm de diâmetro interno (Neodent, Curitiba, PR, Brazil) montada em um contra-ângulo com redução 1:20, com o auxílio de um motor para implantes (DrillerBLM 600 plus, SP, Brasil) a 1500 rpm, sob irrigação externa peristáltica com solução fisiológica salina 0,9%, mantendo a dura-máter íntegra (Figura 3b).

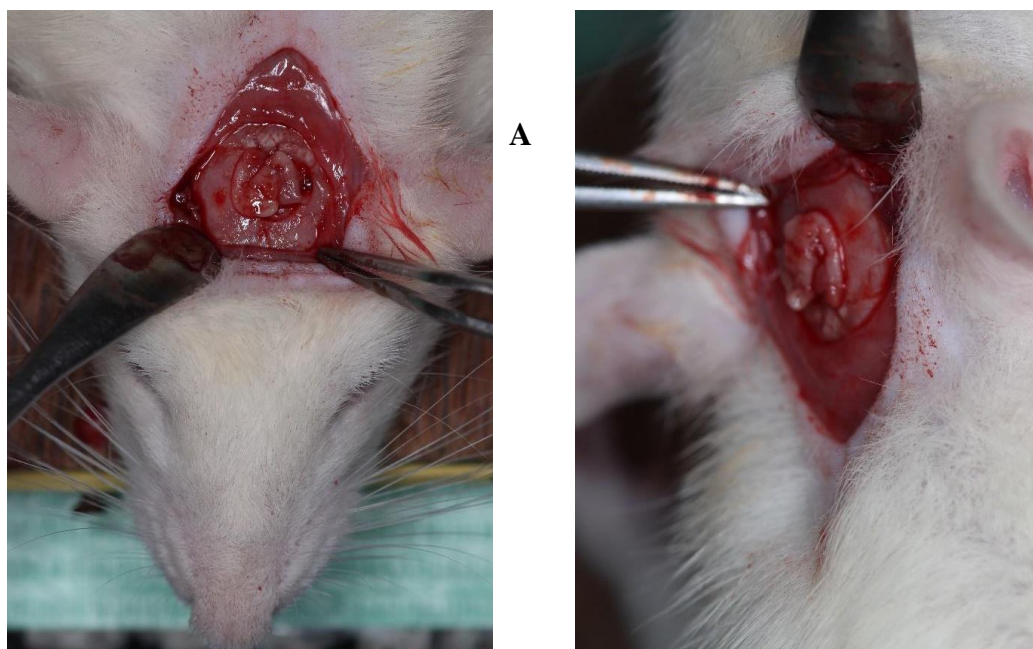
Com relação aos defeitos, estes foram tratados de acordo com a categorização de cada grupo, os tecidos foram reaproximados para a posição inicial com uma sutura simples (com pontos interrompidos), utilizando fio de náilon 5-0 (Procare®, SP, Brasil).

Figura 3 – (a) Defeito ósseo em calota craniana de rato. (b) Remoção de tampão ósseo preservando a dura-máter



Fonte: O autor (2019)

Figura 4 – (a) e (b) – Membrana de PRF posicionada em defeito ósseo



Fonte: O autor (2019)

4.4 Parâmetros da fotobiomodulação com Laser

O aparelho utilizado foi o TFPremier, laser de diodo infravermelho com meio ativo GaAlAs (arseneto de gálio e alumínio), com comprimento de onda de 808 nm (MM Optics Equipamentos, São Paulo). Para os grupos experimentais irradiados (DL e DPRFL, 30 e 60 dias), a primeira sessão de laser ocorreu imediatamente após o procedimento cirúrgico e a cada 48 horas durante 15 dias, na energia de 0,7 joules, densidade de energia de 25 J/cm², de forma pontual, com potência de 70 mW, no modo de emissão contínua, em um tempo de aplicação de 15 segundos.

4.5 Morte dos animais

Todos os grupos tiveram dois tempos de morte: 30 e 60 dias. Os ratos sofreram eutanásia por sobredosagem de anestésico (Tiopental por via endovenosa, três vezes a dose recomendada para a anestesia geral – 30mg/Kg).

As peças cirúrgicas foram colocadas em frascos com tampa identificada, contendo formol a 10%, em quantidade superior ao tamanho da peça, e foram enviadas ao laboratório de anatomia patológica na Faculdade de Odontologia da UFBA.

As áreas de interesse foram acessadas através da dissecação e removidas usando lâmina para autópsia. As amostras removidas foram preparadas para microscopia de luz. Os cortes macroscópicos foram realizados por um mesmo pesquisador nas regiões anterior aos olhos (focinho) e lateralmente às orelhas, além desses cortes realizou-se um corte frontal no sentido de preservar apenas a região superior do cérebro e o crânio (Figura 5).

Figura 5 – Peça cirúrgica enviada ao laboratório



Fonte: O autor (2019)

4.6 Processamento histológico

As peças foram fixadas em solução de formol a 10%, por aproximadamente sete dias. Após a fixação, os segmentos anteriores das calvárias ficaram por 24 horas em ácido fórmico a 10%. Após a descalcificação inicial, cada espécime foi dividido longitudinalmente em dois blocos, exatamente sobre o centro do defeito cirúrgico original, sendo possível determinar os limites do defeito cirúrgico. Os espécimes foram processados e incorporados em parafina. Uma série de secções, na direção longitudinal, no espécime foram feitas em 3 µm de espessura, a partir do centro do defeito cirúrgico original. As secções foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análise microscópica.

4.7 Análise de dados

Foram executadas avaliações descritivas e estatísticas dos dados obtidos. Para as análises realizadas, testes estatísticos serão aplicados, para uma probabilidade de erro de 5% ($p < 0,05$). Para os testes estatísticos, os achados serão categorizados como se apresenta no quadro abaixo (Quadro 1). A classificação de scores foi adotada considerando a extensão da neoformação óssea, a espessura óssea, a atividade osteoblástica, a presença de tecido conjuntivo e a intensidade inflamatória na área detectada baseada no artigo de Padilha et al., (120), alterando a classificação de 0-3 para 1-3, e analisados de forma cega por um examinador calibrado.

Quadro 1 – Variáveis, parâmetros e categorização da avaliação histológica

Variável	Parâmetro histológico	Categorização (score)
Neoformação óssea	● Discreta (até 1/3 da cavidade)	1
	● Moderada (entre 1/3 e 2/3 da cavidade)	2
	● Severa (acima de 2/3 da cavidade)	3
Espessura óssea (vertical)	● Discreta (até 1/3 da cavidade)	1
	● Moderada (entre 1/3 e 2/3 da cavidade)	2
	● Severa (acima de 2/3 da cavidade)	3
Intensidade inflamatória	● Ausente	1
	● Discreta a moderada (25% a 50% das células são inflamatórias)	2
	● Severa (mais 50% das células são inflamatórias)	3
Atividade Osteoblástica	● Discreta (presentes em até 25% do corte)	1
	● Moderada (presentes em até 50% do corte)	2
	● Severa (presentes em mais de 50% do corte)	3
Conjuntivo/fibrose	● Ausente	1
	● Leve a moderada	2
	● Severa	3

Fonte: O autor (2019)

4.8 Análise estatística

As variáveis categóricas foram expressas em frequências absolutas e relativas (percentuais). O teste do Qui-quadrado foi utilizado para comparação das variáveis categóricas, avaliando o quão provável é que qualquer diferença observada aconteça ao acaso. Todos os dados obtidos foram tabulados utilizando o programa Microsoft Excel e analisados estatisticamente com auxílio do programa Minitab®, considerando uma significância de 5% tanto para a comparação intra quanto intergrupos.

5 RESULTADOS

Foi realizada uma avaliação da neoformação óssea, da espessura óssea vertical, da atividade osteoblástica, da intensidade inflamatória e da formação de tecido conjuntivo/fibrose, comparando os grupos em cada um dos tempos (tabelas 2 e 3) e cada grupo de forma isolada (tabelas 4, 5, 6 e 7).

5.1 Avaliação entre os grupos

A tabela 2 apresenta as características de todos os grupos após o período de 30 dias, quando foi obtida diferença significativa na neoformação óssea ($p = 0,039$), na espessura óssea vertical ($p = 0,002$), na atividade osteoblástica ($p = 0,000$) e no tecido conjuntivo/fibrose ($p = 0,025$). Foi observada maior atividade osteoblástica nos grupos experimentais utilizando a membrana de PRF, tendo como consequência uma melhor neoformação e espessura óssea vertical.

O grupo controle apresentou menor espessura óssea vertical quando comparado aos demais grupos. Quanto à formação de tecido conjuntivo/fibrose, mostrou-se ausente em todos os animais do grupo experimental PRF e de forma leve a moderada em 80% dos animais do grupo PRFL. Nos outros dois grupos, C e L, 83,3% dos animais não formaram esse tecido. Em relação à intensidade inflamatória, não foi observada diferença entre os grupos ($p = 0,75$).

Avaliando os grupos após 60 dias (Tabela 2), não houve diferença quanto à neoformação óssea e à intensidade inflamatória. Entretanto, é possível observar que, em 80% dos animais do grupo PRFL, houve maior neoformação óssea ($> 2/3$ da cavidade) seguido pelo grupo PRF, em que 83% dos animais apresentaram neoformação entre $1/3$ a $2/3$ da cavidade. Ainda assim, os grupos continuam com diferença significativa quanto à atividade osteoblástica ($p = 0,020$), à espessura óssea ($p = 0,025$) e à formação de tecido conjuntivo/fibrose ($p = 0,004$).

A atividade osteoblástica continua maior nos grupos, nos quais foi utilizada a membrana autóloga de fibrina, assim como a espessura óssea. Nos grupos C e PRF, não foi formado tecido conjuntivo/ fibrose seguido do grupo PRL, em que 80% dos animais também não apresentaram esse tecido.

Tabela 2 – Comparação entre os grupos após 30 dias

VARIÁVEIS	GRUPO C n = 6	GRUPO L n = 6	GRUPO PRF n = 6	GRUPO PRFL n=5	p (valor)
Neoformação óssea					0,039
≤ 1/3 da cavidade	66,67%	50%	0%	0%	
1/3 a 2/3 da cavidade	16,67%	33,3%	33,3%	40%	
> 2/3 da cavidade	16,67%	16,7%	66,67%	60%	
Espessura óssea vertical					0,002
≤ 1/3 da cavidade	83,3%	16,7%	0%	0%	
1/3 ≥ 2/3 da cavidade	16,7%	83,3%	100%	100%	
> 2/3 da cavidade	0%	0%	0%	0%	
Atividade osteoblástica					0,000
Ausente	66,67%	50%	0%	0%	
Leve a moderada	33,33%	50%	0%	40%	
Severa	0%	0%	100%	60%	
Intensidade inflamatória					0,750
Ausente	16,67%	16,7%	0%	0%	
Leve a moderada	66,67%	66,67%	100%	80%	
Severa	16,67%	16,7%	0%	20%	
Conjuntivo/Fibrose					0,025
Ausente	83,33%	83,33%	100%	20%	
Leve a moderada	16,67%	0,00%	0%	80%	
Severa	0%	16,7%	0%	0%	

C =Controle. L = Laser. PRF = PRF. PRFL = PRF + Laser

Fonte: O autor (2019)

Teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5%^a^aIndica uma diferença estatisticamente significativa (P <0,05)

Tabela 3 – Comparação entre os grupos após 60 dias

VARIÁVEIS	GRUPO C n = 6	GRUPO L n = 6	GRUPO PRF n=6	GRUPO PRFL n=5	P (valor)
Neoformação óssea					0,12
≤ 1/3 da cavidade	16,67%	16,7%	0%	0%	
1/3 a 2/3 da cavidade	66,67%	50%	83,33%	20%	
> 2/3 da cavidade	16,67%	33,33%	16,67%	80%	
Espessura óssea vertical					0,025
≤ 1/3 da cavidade	33,3%	0%	0%	0%	
1/3 ≥ 2/3 da cavidade	66,67%	100%	33,3%	20%	
> 2/3 da cavidade	0%	0%	66,67%	80%	
Atividade osteoblástica					0,020
Ausente	83,33%	50%	0%	20%	
Leve a moderada	16,67%	50%	100%	80%	
Severa	0%	0%	0%	0%	
Intensidade inflamatória					0,52
Ausente	16,67%	0%	0%	0%	
Leve a moderada	83,33%	100%	100%	80%	
Severa	0%	0%	0%	20%	
Conjuntivo/Fibrose					0,004
Ausente	100%	16,7%	100%	80%	
Leve a moderada	0%	83,33%	0%	20%	
Severa	0%	0%	0%	0%	

C =Controle. L = Laser. PRF = PRF. PRFL = PRF + Laser

Fonte: O autor (2019)

Teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5%^a^aIndica uma diferença estatisticamente significativa (P <0,05)

5.2 Avaliação por grupo

Após observação geral dos grupos, foi feita comparação dentro de cada grupo avaliando seu comportamento após 30 e 60 dias.

- **Grupo C**

No grupo controle (defeito com coágulo sanguíneo), não houve diferença significativa entre as variáveis estudadas no período de 30 e 60 dias. (Tabela 4)

Tabela 4 – Avaliação do grupo C entre os tempos (30 e 60 dias)

VARIÁVEIS	GRUPO C 30 n = 6	GRUPO C 60 n = 6	P (valor)
Neoformação óssea			0,146
≤ 1/3 da cavidade	66,67%	16,67%	
1/3 a 2/3 da cavidade	16,67%	66,67%	
> 2/3 da cavidade	16,67%	16,67%	
Espessura óssea vertical			0,079
≤ 1/3 da cavidade	83,3%	33,33%	
1/3 ≥ 2/3 da cavidade	16,7%	66,67%	
> 2/3 da cavidade	0%	0%	
Atividade osteoblástica			0,502
Ausente	66,67%	83,33%	
Leve a moderada	33,33%	16,67%	
Severa	0%	0%	
Intensidade inflamatória			0,25
Ausente	16,67%	16,67%	
Leve a moderada	66,67%	83,33%	
Severa	16,67%	0%	
Conjuntivo/Fibrose			0,54
Ausente	83,33%	100%	
Leve a moderada	16,67%	0%	
Severa	0%	0%	

C = Controle

Teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5%^a^aIndica uma diferença estatisticamente significativa (P <0,05)

Fonte: O autor (2019)

- **Grupo L**

No grupo L, houve diferença significativa ($p = 0,025$) na formação de tecido conjuntivo/fibrose, que se mostrou ausente em 83,3% dos animais após 30 dias, e de forma leve a moderada no mesmo número de animais após 60 dias. Não houve diferença entre as outras variáveis estudadas. (Tabela 5)

Tabela 5 – Avaliação do grupo L entre os tempos (30 e 60 dias)

VARIÁVEIS	GRUPO L 30 n = 6	GRUPO L 60 n = 6	p (valor)
Neoformação óssea			0,465
≤ 1/3 da cavidade	50%	16,67%	
1/3 a 2/3 da cavidade	33,33%	50%	
> 2/3 da cavidade	16,67%	33,33%	
Espessura óssea vertical			0,32
≤ 1/3 da cavidade	16,7%	0%	
1/3 ≥ 2/3 da cavidade	83,33%	100%	
> 2/3 da cavidade	0%	0%	
Atividade osteoblástica			1,00
Ausente	50%	0%	
Leve a moderada	50%	50%	
Severa	0%	50%	
Intensidade inflamatória			0,25
Ausente	16,67%	0,00%	
Leve a moderada	66,67%	100%	
Severa	16,67%	0,00%	
Conjuntivo/Fibrose			0,025
Ausente	83,33%	16,67%	
Leve a moderada	0,00%	83,33%	
Severa	16,67%	0,00%	

L = Laser.

Fonte: O autor (2019)

Teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5%^a^a**Indica uma diferença estatisticamente significativa (P <0,05)**

- **Grupo PRF**

Houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,001$) na atividade osteoblástica, a qual, nos primeiros 30 dias, foi intensa, partindo para moderada após 60 dias em 100% dos animais nos dois períodos.

A espessura óssea vertical mostrou-se presente entre 1/3 e 2/3 da cavidade em 100% dos animais no período de 30 dias e em mais de 2/3 da cavidade em 67% dos animais após 60 dias ($p = 0,014$). Não houve diferença quanto à neoformação óssea, à atividade inflamatória e à formação de tecido conjuntivo nos dois períodos. (Tabela 6)

Tabela 6 – Avaliação do grupo PRF entre os tempos (30 e 60 dias)

VARIÁVEIS	GRUPO PRF 30 n = 6	GRUPO PRF 60 n = 6	P (valor)
Neoformação óssea			0,079
≤ 1/3 da cavidade	0%	0%	
1/3 a 2/3 da cavidade	33,33%	83,33%	
> 2/3 da cavidade	66,67%	16,67%	
Espessura óssea vertical			0,014
≤ 1/3 da cavidade	0%	0%	
1/3 ≥ 2/3 da cavidade	100%	33,33%	
> 2/3 da cavidade	0%	66,67%	
Atividade osteoblástica			0,001
Ausente	0%	0%	
Leve a moderada	0%	100%	
Severa	100%	0%	
Intensidade inflamatória			1
Ausente	0%	00%	
Leve a moderada	100%	100%	
Severa	0%	0%	
Conjuntivo/Fibrose			1
Ausente	0%	100%	
Leve a moderada	100%	0%	
Severa	0%	0%	

PRF = PRF.

Fonte: O autor (2019)

Teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5%^a^aIndica uma diferença estatisticamente significativa (P <0,05)

- **Grupo PRFL**

Não foi observada diferença significativa dentro do grupo PRFL após 30 e 60 dias. Entretanto, nota-se uma boa neoformação óssea (> 2/3 da cavidade) em 60% dos animais após 30 dias e de 80% após 60 dias. A atividade osteoblástica foi mais intensa após 30 dias e de forma leve a moderada após 60 dias. A espessura óssea vertical apresentou-se entre 1/3 e 2/3 da cavidade em 100% dos animais após 30 dias, começando a se apresentar em mais de 2/3 da cavidade após 60 dias. A presença de tecido conjuntivo/fibrose saiu de leve a moderada em 80% dos animais para ausente após 60 dias, na mesma porcentagem de animais. Não houve diferença na atividade inflamatória entre os dois períodos, assim como na formação do tecido conjuntivo ou fibrose. (Tabela 7)

Tabela 7 – Avaliação do grupo PRFL entre os tempos (30 e 60 dias)

VARIÁVEIS	GRUPO PRFL 30 n = 5	GRUPO PRFL 60 n = 5	p (valor)
Neoformação óssea			0,490
≤ 1/3 da cavidade	0,00%	0,00%	
1/3 a 2/3 da cavidade	40%	20%	
> 2/3 da cavidade	60%	80%	
Espessura óssea vertical			0,25
≤ 1/3 da cavidade	0,00%	0,00%	
1/3 ≥ 2/3 da cavidade	100%	80%	
> 2/3 da cavidade	0,00%	20%	
Atividade osteoblástica			0,490
Ausente	0,00%	20%	
Leve a moderada	40%	80%	
Severa	60%	0,00%	
Intensidade inflamatória			1,00
Ausente	0,00%	0,00%	
Leve a moderada	80%	80%	
Severa	20%	20%	
Conjuntivo/Fibrose			0,197
Ausente	20%	80%	
Leve a moderada	80%	20%	
Severa	0%	0%	

PRFL = PRF + Laser

*Houve perda de 02 animais no grupo, totalizando 10 animais.

Fonte: O autor (2019)

Teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5%^a^aIndica uma diferença estatisticamente significativa (P <0,05)

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliado o efeito da membrana de PRF sozinha e associada à LBI em defeitos ósseos críticos na calvária de ratos. Esta região foi escolhida para a confecção do defeito ósseo por ser uma região anatomicamente favorável para a manipulação transoperatória e o controle pós-operatório, minimizando as chances de infecção do sítio cirúrgico (120). Além disso, é uma região livre de estresse mecânico e com relativa estabilidade das estruturas em volta do defeito, visto que o periósteo do crânio e os músculos temporal e frontal formam uma cobertura externa. Assim, esse modelo permite avaliação clínica relevante de terapias ósseas regenerativas, garantindo intervenções clínicas mais eficazes. (122, 123, 124, 125)

Observou-se que o uso da membrana de PRF favoreceu a neoformação óssea e também que a associação deste bioestimulador com a LBI promoveu maior ganho em espessura óssea. Em análise histológica, a neoformação óssea foi significativamente diferente ($p = 0,039$) entre os grupos após os primeiros 30 dias. O melhor resultado foi nos defeitos em que se utilizou a membrana de PRF, assim como para a espessura óssea vertical após 30 ($p = 0,002$) e 60 dias ($p = 0,025$). Este resultado é consistente com Kang et al., (126) que observaram uma otimização da regeneração óssea em defeitos ósseos criados na calvária de ratos utilizando PRF. Da mesma forma, Tajima et al., (127) mostraram que o uso de PRF como um único material de enxerto para elevar o assoalho do seio maxilar concomitante com a instalação do implante permitiu ganho significativo na altura óssea de $4,28 \pm 1,00$ mm antes da cirurgia para $11,8 \pm 1,67$ mm após a cirurgia.

Além disso, Li Q et al., (128) e Oliveira et al. (16) encontraram ganho ósseo alveolar utilizando apenas PRF, demonstrando que a fibrina tem efeito significativo na diferenciação osteogênica. Em relação à confirmação da formação óssea nos grupos, foi feita avaliação da atividade osteoblástica. Por conseguinte, foi observada diferença estatisticamente significante entre eles após 30 ($p = 0,000$) e 60 dias ($p = 0,020$). Entretanto, o grupo que apresentou maior atividade osteoblástica foi o PRF nos dois períodos avaliados, seguido do grupo PRFL, concordando com o estudo To et al., (116), que observaram aumento da atividade osteoblástica quando se utilizaram coágulos de A-PRF nos alvéolos após exodontias em cães. Além disso, imunoexpressões mais elevadas de marcadores da atividade dos osteoblastos, dos osteoclastos e da função vascular, como a

osteocalcina e a osteopontina, foram encontradas no osso recém-formado no grupo A-PRF, em comparação ao grupo controle.

Houve diferença significativa entre os grupos quanto à presença de tecido conjuntivo/fibrose ao avaliar os períodos experimentais de 30 e 60 dias. No entanto, não foi observado tecido conjuntivo/fibrose no grupo PRF após 60 dias, diferentemente do encontrado por Oliveira et al. (16), em que os autores observaram predominância de tecido conjuntivo e de fibroblastos na superfície dos defeitos ósseos tratados com fibrina.

A busca por métodos não invasivos, como a terapia de fotobiomodulação a laser, vem aumentando nos últimos anos para melhorar o processo de reparo ósseo (84). Neste estudo foi utilizado o laser de diodo infravermelho com meio ativo GaAlAs, comprimento de onda de 808nm, densidade de energia de 25J/cm² e potência de 70 mW. Ao avaliar os espécimes em que foi utilizada a LBI, notou-se que, após 30 e 60 dias, o grupo L apresentou melhor ganho ósseo apenas quando comparado ao grupo controle, tendo resultado inferior aos grupos que utilizaram a membrana de PRF. Estes resultados são consistentes com os de Mehdiyev, et al., (85), que observaram aumento da densidade óssea após o levantamento de seio maxilar e a instalação simultânea de implantes dentários utilizando a LBI associada em relação grupo controle ($p < 0,05$).

Embora haja resultados positivos quanto ao reparo ósseo utilizando a LBI isolada, os biomoduladores têm sido utilizados com o intuito de melhorar a osseointegração e a neoformação óssea em torno de implantes dentários (129, 115). Entretanto, neste estudo foi observado que, após 30 dias, não houve diferença na neoformação óssea quando se utilizou a membrana de PRF de forma isolada ou associada à LBI. Contudo, após 60 dias, a neoformação óssea se apresentou de forma mais predominante no grupo PRFL. Diferente dos resultados obtidos nesta pesquisa, Jonasson et al., (86) não detectaram aumento significativo na densidade óssea em defeitos críticos na calvária de ratos, que receberam concentrado plaquetário de forma isolada ou associada à LBI. Essa diferença entre os resultados pode ser devido ao tipo de concentrado plaquetário utilizado que, no atual estudo, foi a PRF e, no estudo de Jonasson et al., (86), o PRP.

Ainda há dúvidas sobre eficácia real do PRP, pois muitos estudos sugerem que, devido à rápida liberação de fatores de crescimento, este produto produz um efeito imediato e transitório que é insignificante para a reparação tecidual (130). O concentrado plaquetário de segunda geração, a PRF (131) possui fatores de crescimento e citocinas

capturados na malha da rede de fibrina e, portanto, exercem um efeito gradual e mais longo no processo de reparo tecidual, uma vez que são liberados lentamente, tendo evidência positiva desse efeito da PRF no reparo de tecidos orais, incluindo a regeneração óssea. (130)

Quanto à espessura óssea, o grupo PRFL se comportou de forma semelhante ao grupo DPRF após 30 dias, mas diferiu dos demais grupos, apresentando melhor espessura óssea ($p = 0,000$). Após 60 dias, no entanto, o grupo PRFL se destacou, apresentando maior espessura óssea do que os demais grupos ($p = 0,025$). Por sua vez, Arakeeb et al., (129) avaliaram a densidade óssea em volta de implantes dentários utilizando a membrana de PRF associada ao LBI (laser de diodo 808 nm e 20 J/cm³) e encontraram maior neoformação óssea em relação ao grupo que utilizou apenas o LBI, entretanto, menor aquisição óssea foi observada quando comparada ao grupo PRF. Em contrapartida, Sleem et al., (115) concluíram que não há diferenças estatisticamente significativas nos valores de densidade óssea entre os sítios em que os implantes foram instalados e tratados com PRF e com LBI (830 nm., 100 mW e 92,1 J/cm²) em comparação aos sítios tratados apenas com PRF. Os diferentes resultados encontrados podem ser justificados devido à diferença nos protocolos utilizados, em que a potência da laserterapia, o protocolo de obtenção da PRF e a avaliação da neoformação óssea diferiram entre os estudos.

Avaliando a atividade inflamatória, não houve diferença significativa entre os grupos após os dois períodos avaliados. Diferentemente, Padilha et al., (120) evidenciaram o efeito da PRF em reduzir o processo inflamatório após 05 e 30 dias, otimizando assim os estágios iniciais do processo de reparo tecidual. Preocupações quanto à coleta de amostras de sangue animal foram levantadas por Dohan et al., (12), trazendo o tempo entre a coleta e a centrifugação como fator crucial no protocolo da PRF. Os autores desse mesmo estudo investigaram o uso de tubos de vidro e de plástico com jateamento interno, concluindo que a utilização de tubos plásticos jateados parecem não influenciar na arquitetura da membrana de fibrina.

No entanto, no presente trabalho, o método utilizado diferenciou-se quanto à natureza desses tubos. Foram utilizados tubos plásticos sem jateamento interno de sílica no intuito de evitar a formação precoce do coágulo de fibrina e impedir a rápida coagulação do sangue antes da centrifugação. Desse modo, para viabilizar a coleta sanguínea de acordo com o tempo estabelecido pelo protocolo, as amostras sanguíneas para a confecção da

membrana foram feitas através da punção intracardíaca. Quanto à natureza da membrana de fibrina, no estudo de Oliveira et al., (16) não foi encontrada diferença significativa entre o grupo de ratos que utilizou membrana autóloga de PRF em defeitos críticos na calvária e o grupo que utilizou membrana de PRF homóloga. Isso demonstra que o uso de membrana homóloga de PRF não seria uma limitação para o nosso estudo.

Em relação ao reparo ósseo, sabe-se que é um processo complexo e que envolve diferentes tipos celulares e diferentes mediadores químicos (120). Ele envolve fases como inflamação, formação de tecido conjuntivo inicial, tecido conjuntivo maduro e remodelação óssea (132). Nesta pesquisa, após 30 dias, o grupo PRFL apresentou maior presença de tecido conjuntivo que os demais, ocorrendo remissão do tecido após 60 dias, mas não de forma completa. O mesmo resultado, utilizando a LBI, foi encontrado por Khadra et al., (22), os quais observaram a formação de tecido conjuntivo mais pronunciada nos grupos irradiados após 14 dias ($p = 0.04$), mas não após 28 dias. Outros estudos demonstraram aumento na produção de colágeno ou no tecido conjuntivo imaturo após a LBI (133), e é provável que a presença do tecido conjuntivo inicial seja um efeito precoce da LBI. Entretanto, ainda não se sabe se a biomodulação da formação óssea tem um efeito geral nas células mesenquimais ou se ocorre uma estimulação direta dos osteoblastos. (80)

No grupo PRFL foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,025$) no grupo L para a presença de tecido conjuntivo/fibrose, sendo esta diferença maior nos primeiros 30 dias. Embora os outros grupos não tenham se diferenciado quanto à presença desse tecido, é possível que os resultados observados nos grupos que passaram pela laserterapia ocorram devido ao aumento da liberação de fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblastos, o qual atua sobre células diferenciadas e aumenta a proliferação celular e a secreção de componentes da matriz. (134)

Além de a LBI promover a proliferação e a diferenciação de osteoblastos (51), inibir a diferenciação de osteoclastos (64) e induzir ao processo de mineralização (65), as citocinas e os fatores de crescimento fornecidos pela PRF tendem a acelerar a migração celular e a resposta inflamatória, promovendo ainda mais a reparação tecidual (135). Portanto, associar esses dois biomoduladores, no intuito de melhorar a neoformação óssea e a osseointegração em volta de implantes dentários, pode auxiliar a contornar os problemas mecânicos e de integração tecidual.

A membrana de PRF tem sido associada ao reparo ósseo mais rápido e à redução da reabsorção do osso alveolar (102, 103). Somado a isso, o efeito biomodulador da LBI sobre a regeneração óssea tem sido observado anteriormente sob diferentes condições experimentais (115, 120, 129). Este estudo mostrou que o uso de tubos plásticos sem jateamento interno de sílica pareceu não influenciar na arquitetura da membrana de PRF, entretanto pode haver influência quanto aos fatores de crescimento.

O tamanho da amostra, a perda de dois animais do grupo experimental PRFL e a não padronização dos protocolos terapêuticos utilizados podem ser limitações deste estudo. Ainda não há protocolo definido da LBI utilizada em defeitos ósseos críticos, assim como para método de obtenção da membrana de PRF em ratos. Em relação a esta última, tem-se encontrado na literatura diferentes técnicas de obtenção, no intuito de aumentar a quantidade de fatores de crescimento na sua rede de fibrina, seja em estudos com humanos ou em animais. Quanto ao uso da LBI, é reconhecido que outros fatores, como a fase de crescimento celular (136), a frequência e o número de sessões (137) também influenciam no resultado final. Portanto, sugere-se o desenvolvimento de estudos a fim de investigar protocolos do uso da LBI e a obtenção da PRF, avaliando suas propriedades cuidadosamente.

7 CONCLUSÕES

- A neoformação óssea e a espessura óssea vertical se comportaram de forma semelhante nos defeitos tratados com membrana de PRF após 30 dias;
- A atividade osteoblástica se comportou de forma mais intensa no grupo DPRF após os dois períodos experimentais;
- Houve maior neoformação óssea e espessura óssea vertical quando utilizada a membrana de PRF associada à LBI após 60 dias;
- A atividade osteoblástica se encontrou quase que ausente no grupo controle após 60 dias;
- A presença de tecido conjuntivo/fibrose foi ausente no grupo DPRF após os dois períodos avaliados.

8 REFERÊNCIAS

1. Hadjidakis, DJ, Androulakis, I.I. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006 Dec;1092: 385-96.
2. Miron RJ, Zhang YF. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *J Dent Res*, 2012; 91:736–744.
3. Ge J, Yang C, Wang Y, Zheng J, Hua H, Zhu J Comparison of different grafting materials for treatment of bone defect distal to the molar in canine. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2018; 20:444–454.
4. Caridade SG, Mano JF. Engineering membranes for bone regeneration. *Tissue Eng Part A*, 2017; 23:1502–1533.
5. Kobayashi E et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig*. 2016; 20:2353–2360.
6. Bowler D, Dym H. Bone morphogenic protein: application in implant dentistry. *Dent Clin N Am*. 2015; 59:493–503.
7. Brown KLB, Cruess RL. Bone and cartilage transplantation surgery. *J Bone Jt Surg Am*. 1982; 64:270-9.
8. Enneking WF, Eady JL, Burchardt H. Autogenous cortical bone grafts in the reconstruction of segmental skeletal defects. *J Bone Jt Surg Am* 1980;62-A:1039-58.
9. Kassolis JD, Reynolds MA. Evaluation of the adjunctive benefits of platelet-rich plasma in subantral sinus augmentation,” e *Journal of Craniofacial Surgery*, 2005. 16, (2): 280–287.
10. Castro AB et al. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2017;44(1): 67–82.
11. Sherif A, Saleh, AB, Hesham A. Platelet-Rich Fibrin in Maxillary Sinus Augmentation: A Systematic Review, *Journal of Oral Implantology*, 2015;41(6):746-753.
12. Dohan Ehrenfest, David M. How to optimize the preparation of Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF, Choukroun’s technique) clots and membranes: introducing the PRF Box. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 2010. 110 (3); 275-278.
13. Choukroun J, Adda F, Shoeffler C, Vervelle A. Uneopportunité en paro-implantologie: le PRF. *Implantodontie*. 2001; 42: 55-62.
14. Ghanaati S, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol*, 2014. 40:679–689.
15. Galav S, Chandrashekar KT, Mishra R, Tripathi V, Agarwal R, Galav A: Comparative evaluation of platelet-rich fibrin and autogenous bone graft for the treatment of infrabony defects in chronic periodontitis: Clinical, radiological, and surgical reentry. *Indian J Dent Res*. 2016. 27(5):502-507.

16. Oliveira, M. R., Silva, A. de C., Ferreira, S, Avelino CC, Garcia IR Jr, Mariano RC. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2015; 44(5): 649–655.
17. Nacopoulos CI et al. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *Journal of Oral Rehabilitation.* 2006; 33(8):619-924.
18. Garcia VG, 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.* 2013; 28:407-414.
19. Wu J et al. Low-power GaAlAs laser irradiation promotes the proliferation and osteogenic differentiation of stem cells via IGF1 and BMP2. *PLoS One.* 2012; 7 (9).
20. Lirani-Galvão AP, Jorgetti V, da Silva OL. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(6):735-40.
21. KORANY, N. S. et al. Evaluation of socket healing in irradiated rats after diode laser exposure. *Archives of Oral Biology*, v. 57, n .7, p. 884-891, 2012.
22. Khadra M, Kasem N, Haanaes HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97:693–700.
23. Freitas NC et al. Evaluation of photobiomodulation therapy associated with guided bone regeneration in critical size defects. *In vivo study. J. Appl. Oral Sci.* 2017; 26.
24. Mehdi, Farokhi et al. Importance of dual delivery systems for bone tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 2016; 225: 152-169.
25. Tortora, GJ. *Corpo Humano: Fundamentos de anatomia e Fisiologia*, 4^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2000.
26. CONSTANTINEUSCU, G. M. *Clinical Anatomy for Small Animal Practitioners*. 1. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2002, 381p.
27. DATTA, H. K. The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology*, London, v. 61, n. 5, p. 577-87, 2008.
28. JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. *Histologia básica – 11ed.* Rio de Janeiro. 2008. Guanabara Koogan.
29. KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases*, Houndmills, v. 8, n. 3, p. 147-59, 2002.
30. MARIEB, E. N. *Human & Physiology*. 6. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2003, 1237p.
31. AKERS, R. M.; DENBOW, D. M. *Bones and Skeletal System. Anatomy & Physiology of Domestic Animals*. Iowa: Blackwell Publishing, 2008, p.131-168.
32. Kihara T, Hirose, M, Oshima, A, Ohgushi, H., 2006; Exogenous Type I Collagen Facilitates Osteogenic Differentiation and Acts as a substrate for Mineralization of Rat.

33. Tachibana A, Kaneko S, Tanabe T, Yamauchi, K. Rapid Fabrication of Keratin-Hydroxyapatite Hybrid Sponges Toward Osteoblast Cultivation and Differentiation, *Biomaterials*. 2005. 26: 297-302.
34. Carvalho HF, Collares-Buzato CB. *Células: Uma Abordagem Multidisciplinar*, 1ª ed. São Paulo: Manole; 2005.
35. Mackie, EJ. Osteoblasts: Novel roles in Orchestration of Skeletal Architecture, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2003;35:1301-1305.
36. ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Revista de Odontologia da UNESP, Araraquara*, v.35, n.2, p.191-198, 2006.
37. Kikuchi M et al. The biomimetic synthesis and biocompatibility of self-organized hydroxyapatite/collagen composites, *Bioceramics*, 1999. 12: 393-396.
38. AL-AQL, Z. S.; ALAGL, A. S.; GRAVES, D. T.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction. *Journal of Dental Research*, Washington, v.87, n.2, p.107-118, 2008.
39. Alberts B, Johnson A, L J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
40. Karageorgiou, V. and Kaplan, D. (2005) Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis. *Biomaterials*, 26, 5474-5491.
41. Landis, WJ. Silver, F.H. The structure and Function of Normally Mineralizing Avian Tendons”, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 2002; 133:1135-1157.
42. Pinheiro ALB, Brugnera Junior A, Zanin FAP. (Org.). *Aplicação do Laser na Odontologia*. São Paulo; Santos, 2010.
43. GARCEZ, Aguinaldo Silva; RIBEIRO, Martha Simões; NÚÑEZ, Silvia Cristina. *Laser de Baixa Potência –Princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia*. Rio de Janeiro: Elsevier. 2012. 259p.
44. . Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A and Binderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2006; 33(8):619-924.
45. Basford, JR. Low intensity laser therapy: Still not an established clinical tool. *Lasers Surg. Med*. 1995; 16 (4) 331–342.
46. Belkin M, Schwartz M. New biological phenomena associated with laser radiation. *Health Physics*. 1989; 56(5): 687-690.
47. Noba C et al. Laser for bone healing after oral surgery: systematic review. *Lasers in Medical Science*. 2018; 3(3): 667-674.
48. Hamad SA, Naif JS, Abdullah MA. Effect of diode laser on healing of tooth extraction socket: an experimental study in rabbits. *J Maxillofac Oral Surg*. 2016; 15 (3): 308–314.

49. Brawn PR, Kwong-Hing A. Histologic comparison of light emitting diode phototherapy-treated hydroxyapatite-grafted extraction sockets: a same-mouth case study. *Implant Dent.* 2007; 16(2): 204–211.
50. Karu TI, Pyatibrat LV, Kolyakov SF, Afanasyeva NI. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *J Photochem Photobiol B.* 2005; 81(2):98–106.
51. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23(2):161–166.
52. Prados-Frutos JC, Rodriguez-Molinero J, Prados-Privado M, Torres JH, Rojo R. Lack of clinical evidence on low-level laser therapy (LLLT) on dental titanium implant: a systematic review. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(2):383–392.
53. Han M, Fang H, Li QL, Cao Y, Xia R, Zhang ZH (2016) Effectiveness of laser therapy in the management of recurrent aphthous stomatitis: a systematic review. *Scientifica (Cairo)* 2016: 9062430. <https://doi.org/10.1155/2016/9062430>.
54. Choi K et al. Low-level laser therapy promotes the osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells seeded on an acellular dermal matrix, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2013; 101 (6): 919–928.
55. Migliario M, Pittarella P, Fanuli M, Rizzi M, Renò F. Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. *Lasers Med Sci.* 2014; 29(4): 1463–1467.
56. Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24:169–78.
57. Huertas RM, Luna-Bertos ED, Ramos-Torrecillas J, Leyva FM, Ruiz C, Garcia-Martinez O. Effect and clinical implications of the low-energy diode laser on bone cell proliferation. *Biol Res Nurs.* 2014; 16(2):191.
58. Amid R, Kadkhodazadeh M, Ahsaie MG, Hakakzadeh A. Effect of low level laser therapy on proliferation and differentiation of the cells contributing in bone regeneration. *J Lasers Med Sci.* 2014; 5(4):163.
59. Ghahroudi AAR et al Effect of low-level laser therapy irradiation and Bio-Oss graft material on the osteogenesis process in rabbit calvarium defects: a double blind experimental study, *Lasers Med. Sci.* 2014; 29(3): 925–932.
60. Shakouri SK, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci.* 2010; 25(1):73-7.
61. Renno AC, McDonnell PA, Crovace MC, Zanotto ED, Laakso L. Effect of 830 nm laser phototherapy on osteoblasts grown in vitro on Biosilicate scaffolds. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(1): 131-133.
62. de Oliveira LSS, de Araujo AA, de Araujo Junior RF, Barboza CAG, Borges BCD, da Silva JSP. Lowlevel laser therapy (780 nm) combined with collagen sponge scaffold promotes repair of rat cranial critical-size defects and increases TGF-beta, FGF-2, OPG/RANK and osteocalcin expression. *Int J ExpPathol* 2017; 98(2): 75-85.

63. Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol*. 1996; 23(5):492–496.
64. Xu M et al. Low-intensity pulsed laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarial cells. *Photomed Laser Surg*. 2009; 27(2):309–315.
65. Fukuhara E, Goto T, Matayoshi T, Kobayashi S, Takahashi T. Optimal low-energy laser irradiation causes temporal G2/Marrest on rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int*. 2006; 79(6):443–450.
66. Stein E, et al. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr*. 2008; 120(3–4):112–117.
67. Schwartz-Filho HO, Reimer AC, Marcantonio C, Marcantonio E Jr, Marcantonio RAC. Effects of low-level laser therapy (685nm) at different doses in osteogenic cell cultures. *Lasers Med Sci*. 2011; 26:539–543.
68. Huang YY, Chen AC-H, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response*. 2009; 7(4): 358–383.
69. Seifi M, Shafeei HA, Daneshdoost S, Mir M. Effects of two types of low-level laser wavelengths (850 and 630nm) on the orthodontic tooth movements in rabbits. *Lasers Med Sci*. 2007; 22:261–264.
70. Goulart CS, Nouer PRA, Martins LM, Garbin IU, Lizarelli RFZ. Photoradiation and orthodontic movement: experimental study with canines. *Photomed Laser Surg*. 2006; 24:192–196.
71. Altan AB, Bicakci AA, Avunduk MC, Esen H. The effect of dosage on the efficiency of LLLT in new bone formation at the expanded suture in rats. 2015; 30(1): 255-62.
72. Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1997; 111:525–532.
73. da Silva AP, Petri AD, Crippa GE, Stuardi AS, Stuardi AS, Rosa AL, Stuardi MB (2012) Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Lasers Med Sci* 27(4):777–783.
74. Gross AJ, Jelkmann W. Helium-neon laser irradiation inhibits the growth of kidney epithelial cells in culture. *Lasers Surg Med*. 1990; 10:40-1.
75. Sattayut S, Hughes F, Bradley P. 820 nm gallium aluminium arsenide laser modulation of prostaglandin E2 production in interleukin-1 stimulated myoblasts. *Laser Therapy* 1999;11:88-95.
76. de Almeida JM et al. Influence of lowlevel laser therapy on the healing process of autogenous bone block grafts in the jaws of systemically nicotine-modified rats: a histomorphometric study. *Arch Oral Biol*. 2017; 75:21–30.
77. Monea A, Beresescu G, Boeriu S, Tibor M, Popsor S, Antonescu DM. Erratum to: bone healing after low-level laser application in extraction sockets grafted with allograft material and covered with a resorbable collagen dressing: a pilot histological evaluation. *BMC Oral Health*. 2016; 16:16.

78. Romao MM, Marques MM, Cortes AR, Horliana AC, Moreira MS, Lascala CA. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of human alveolar bone repair induced by laser phototherapy: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 44(12): 1521-8.
79. Zaky AA, El Shenawy HM, Harhsh TA, Shalash M, Awad NM. Can low level laser therapy benefit bone regeneration in localized maxillary cystic defects? - a prospective randomized control trial. *Open Access Maced J Med Sci.* 2016; 4(4):720–725.
80. Pinheiro AL et al. 2003.Effect of Low Level Laser Therapy on the Repair of Bone Defects Grafted with Inorganic Bovine Bone. *Braz. Dent. J.* 2003. 14(3).
81. Rasouli Ghahroudi AA, et al. Effect of low-level laser therapy irradiation and Bio-Oss graft material on the osteogenesis process in rabbit calvarium defects: a double blind experimental study. *Lasers Med Sci.* 2014;29(3):925-32.
82. Batista PSC, Sant'ana Filho, Manoel. Avaliação microscópica do processo de reparo em cavidades ósseas submetidas a implante de osso liofilizado bovino, 2001.
83. Kitayama S, Wong LO, Ma L, Hao J, Kasugai S, Lang NP, et al. Regeneration of rabbit calvarial defects using biphasic calcium phosphate and a strontium hydroxyapatite-containing collagen membrane. *Clin Oral Implants Res.* 2015;27(12): 206-14.
84. Pomini KT et al. Fibrin Sealant Derived from Human Plasma as a Scaffold for Bone Grafts Associated with Photobiomodulation Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019: 10;20(7).
85. Mehdiyev I, Gülsen U, Sentürk FM, Sayan, NB. Radiographic Evaluation of Low-Level Laser Therapy-Enhanced Maxillary Sinus Augmentation with Simultaneous Dental Implant Placement. *Ann Maxillofac Surg.* 2019; 9(1): 48–52.
86. Jonasson TH et al. Effects of low-level laser therapy and platelet concentrate on bone repair: Histological, histomorphometric, immunohistochemical, and radiographic study. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45(11):1846-1853.
87. Yilmaz D, Dogan N, Ozkan A, Sencimen M, Eren B Mutlu I. Effect of platelet rich fibrin and beta tricalcium phosphate on bone healing. A histological study in pigs. *Acta Cirúrgica Bras.* 2014; 29(1), 59–65.
88. Christensen, K. et al. Autologous platelet gel: an in vitro analysis of platelet-rich plasma using multiple cycles. *J. Extra Corpor. Technol.* 2006; 38, 249–253.
89. Matras, HD. Wirkungen verschiedener Fibrinpräparate auf Kontinuität-störungen der Rattenhaut. *Osterr. Z. Stomatol.* 1970; 67: 338-359.
90. Gibble, J.W. and Ness, P.M. (1990) Fibrin glue: the perfect operative sealant? *Transfusion* 1990;30, 741–74781.
- Comarck DH. *Histologia*, 9ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A;1991.
91. Dohan DM et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101:37–44.

92. Tsirogianni AK, Moutsopoulos NM, Moutso-poulos HM. Wound healing: immunological aspects. *Injury*. 2006;37(Suppl 1):5–12.
93. Pluemsakunthai W, Kuroda S, Shimokawa H, Kasugai S. A basic analysis of platelet-rich fibrin: distribution and release of platelet-derived growth factor- BB. *Inflammation Regenerat* 2013; 33: 164-172.
94. Dragonas P, Katsaros T, Avila-Ortiz G, Chambrone L, Schiavo JH, Palaiologou A5. Effects of leukocyte–platelet- rich fibrin (L-PRF) in different intraoral bone grafting procedures: a systematic review *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2019;48(2):250-262.
95. Gassling V, Douglas T, Warnke PH, Acil Y, Wiltfang J, Becker ST. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:543–9.
96. Gassling V, Hedderich J, Acil Y, Purcz N, Wiltfang J, Douglas T. Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applica-tions. *Clin Oral Implants Res*. 2013; 24:320–8.
97. Ozgul O et al. Efficacy of platelet rich fibrin in the reduction of the pain and swelling after impacted third molar sur- gery: randomized multicenter split-mouth clinical trial. *Head Face Med*. 2015;11:37.
98. Uyanik LO, Bilginaylar K, Etikan I. Effects of platelet-rich fibrin and Piezosurgery on impacted mandibular third molar surgery outcomes. *Head Face Med*. 2015;11:25.
99. Kumar YR et al. Platelet-rich fibrin: the benefits. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2016; 54:57–61.
100. Eshghpour M, Dastmalchi P, Nekooei AH, Nejat A. Effect of platelet-rich fibrin on
101. Hoaglin DR, Lines GK. Prevention of localized osteitis in mandibular third-molar sites randomized clinical trial. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014;72: 1463–7.
102. Choukroun J et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 101:299–303.
103. Temmerman A et al. The use of leucocyte and platelet-rich fibrin in socket management and ridge pres-ervation: a split-mouth, randomized, con-trolled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2016; 43:990–9.
104. Zhang Y, Tangl S, Huber CD, Lin Y, Qiu L, Rausch-Fan X. Effects of Choukroun’s plate-let-rich fibrin on bone regeneration in com-bination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: a histological and histomorphometric study. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012; 40:321–8.
105. Suttapreyasri S, Leepong N. Influence of platelet-rich fibrin on alveolar ridge pres-ervation. *J Craniofac Surg*. 2013; 24:1088–94.
106. Bosshardt DD, Bornstein MM, Carrel JP, Buser D, Bernard JP. Maxillary sinus graft-ing with a synthetic, nanocrystalline hy-droxyapatite-silica gel in humans: histologic and histomorphometric results. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2014; 34:259–67.

107. Suttapreyasri S, Leepong N. Influence of platelet-rich fibrin on alveolar ridge preservation. *J Craniofac Surg* 2013;24:1088–94.
108. Alzahrani AA, Murriky A, Shafik S. Influence of platelet rich fibrin on post-extraction socket healing: a clinical and radiographic study. *Saudi Dent J.* 2017; 29:149–55.
109. Moussa M, El-Dahab OA, El Nahass H. Anterior maxilla augmentation using palatal bone block with platelet-rich fibrin: a controlled trial. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2016; 31:708–15.
110. Abdullah WA. Evaluation of bone regenerative capacity in rats claverial bone defect using platelet rich fibrina with and without beta tri calcium phosphate bone graft material. *Saudi Dent J.* 2016;28(3):109-17.
111. Karayürek F et al. combining platelet rich fibrin with different bone graft materials: an experimental study on the histopathological and immunohistochemical aspects of bone healing. *J Craniomaxillofac Surg.* 2019;47(5):815-825.
112. Xuan F, Lee CU, Son JS, Jeong SM, Choi BH: A comparative study of the regenerative effect of sinus bone grafting with platelet-rich fibrin-mixed Bio-Oss® and commercial fibrinmixed Bio-Oss®: an experimental study. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 42(4):47-50, 2014.
113. Luger EJ, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekel S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers Surg Med.* 1998; 22:97–102.
114. Lam TS, Abergel RP, Meeker CA, Castel JC, Dwyer RM, Uitto J. Laser stimulation of collagen synthesis in human skin fibroblast cultures. *Lasers Life Sci.* 1982; 1:61–77.
115. Sleem SSMEB, Zayet MK, El-Ghareeb TI. Evaluation of The Bio-Stimulatory Effect of Platelet Rich Fibrin Augmented by Diode LASER Compared to Platelet Rich Fibrin Alone on Dental Implant Replacing Posterior Mandibular Teeth. *Randomised Clinical Trial: Split Mouth Study.* *Open Access Maced J Med Sci.* 2019. 15; 7(5): 869–875.
116. To M, Su CY, Hidaka K, Okudera T, Matsuo M. Effect of advanced platelet-rich fibrin on accelerating alveolar bone formation in dogs: a histological and immunofluorescence evaluation. *Anat Sci Int.* 2019; 94(3):238-244.
117. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response. *J Periodontol.* 2017; 88:112–121.
118. Clark D et al. Advanced platelet-rich fibrin and freeze-dried bone allograft for ridge preservation: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2018; 89(4):379–387.
119. Masahiro To et al. Effect of advanced platelet-rich fibrin on accelerating alveolar bone formation in dogs: a histological and immunofluorescence evaluation 2019.
120. Padilha WSM et al. Histologic Evaluation of Leucocyte- and Platelet-Rich Fibrin in the Inflammatory Process and Repair of Noncritical Bone Defects in the Calvaria of Rats. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2018; 33(6):1206-1212.

121. Influence of Fractionation Methods on Physical and Biological Properties of Injectable Platelet-Rich Fibrin: An Exploratory Study.
122. Spicer P.P., Kretlow J.D., Young S., Jansen J.A., Kasper F.K., Mikos A.G. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc.* 2012;7(10):1918–1929.
123. Pearce A.I., Richards R.G., Milz S., Schneider E., Pearce S.G. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cells Mater.* 2007;13:1–10
124. Schmitz J.P., Hollinger J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1986;205:299–308.
125. Takagi K., Urist M.R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann. Surg.* 1982;196:100–109.
126. Kang YH et al. Platelet-rich fibrin is a bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue Eng A* 2011;17:349–59.
127. Tajima N, Ohba S, Sawase T, Asahina I. Evaluation of sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using platelet-rich fibrin as sole grafting material. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28:77–83.
128. Li Q et al. Platelet-rich fibrin promotes periodontal regeneration and enhances alveolar bone augmentation. *Biomed Res Int.* 2013.
129. Arakeeb MAA, Zaky AA, Harhash TA, Salem WS, El-Mofty M. Effect of Combined Application of Growth Factors and Diode Laser Bio-Stimulation on the Osseo Integration of Dental Implants. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019. 15; 7(15): 2520–2527.
130. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu Y. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:707–13.
131. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:56–60.
132. Ghiasi MS, Chen J, Vaziri A, Rodriguez EK, Nazarian. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. *Bone Rep.* 2017; 16(6):87-100.
133. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. *Lasers Surg Med.* 1998;22:281-287.
134. Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, Turek TJ, Wozney JM, Wikesjö UME. Periodontal repair in dogs: recombinant bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodontol.* 1995; 66:131-138.
135. Messori MR et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontol Res.* 2007; 43(2): 217–23.

136. Osawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-power laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone*. 1998; 22:347-354.
137. Silva Júnior AN, Pinheiro ALB, 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- 87.

9 ANEXO A

APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA (ICS/UFBA)



Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências da Saúde - UFBA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação comparativa da membrana de colágeno e de PRF irradiadas com laser de diodo em defeito ósseo: Estudo em modelo experimental em ratos", protocolada sob o CEUA nº 5541150219, sob a responsabilidade de **Tania Tavares Rodriguez** e equipe; *Luciana Maria Pedreira Ramalho; Lorena Ferraz Santos Silva* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde) (CEUA/ICS.UFBA) na reunião de 22/02/2019.

We certify that the proposal "Comparative evaluation of collagen membrane and PRF irradiated with diode laser in bone defect: Study in experimental model in rats", utilizing 91 Heterogenics rats (91 males), protocol number CEUA 5541150219, under the responsibility of **Tania Tavares Rodriguez and team; Luciana Maria Pedreira Ramalho; Lorena Ferraz Santos Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Bahia (Health Sciences Institute) (CEUA/ICS.UFBA) in the meeting of 02/22/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2019** a **12/2019** Área: **Ciências da Saúde**

Origem: **SUPRILAB SUPRIMENTO DE LABORATORIO E BIOTERIO LTDA**

Espécie: **Ratos heterogênicos** sexo: **Machos** idade: **2 a 3 meses** N: **91**

Linhagem: **Wistar** Peso: **250 a 350 g**

Local do experimento: **Biotério de experimentação do Laboratório de Neuro-imunoendocrinologia e Toxinologia**

Salvador, 22 de fevereiro de 2019

Dra. Luciana Lyra Casals-e-Silva
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)

MSc. Marcos Borges Ribeiro
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)