

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

RAFAELA SQUASSONI LOURENÇO

**EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO, VIDRO BIOATIVO BAG-S53P4 E LASER NO
PROCESSO DE REPARO ÓSSEO**

BAURU

2019

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

RAFAELA SQUASSONI LOURENÇO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da UniSagrado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia, sob orientação do Prof. Dr. Hugo Nary Filho

BAURU

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de
acordo com ISBD

L868e	<p>Lorenco, Rafaela Squassoni</p> <p>Efeito do ácido zolêdronico, vidro bioativo bag-s53p4 e laser no processo de reparo ósseo / Rafaela Squassoni Lorenco. -- 2019. 55f. : il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Hugo Nary Filho Coorientadora: Prof.^a Dra. Jessica Lemos Gulinelli</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em odontologia) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP</p> <p>1. Bisfosfonatos. 2. Laser. 3. Regeneração Óssea. 4. Vidro Bioativo. 5. Osteonecrose. I. Nary Filho, Hugo. II. Gulinelli, Jessica Lemos. III. Título.</p>
-------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Banca examinadora

Hugo Nary Filho

Prof. Dr.

UniSagrado

Leandro de Andrade Holgado

Prof. Dr.

UniSagrado

Roberto Yoshio Kawakami

Prof. Dr.

UniSagrado

Bauru, 04 de dezembro de 2019.

RESUMO

Um dos tratamentos adjuvantes para a osteonecrose medicamentosa é a laserterapia. O vidro bioativo S53P4, à base de sílica com propriedades osteocondutoras, antibacterianas e angiogênicas também poderia auxiliar no seu tratamento. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o processo de reparo ósseo em defeitos críticos criados cirurgicamente na calvária de ratas submetidas a terapia com ácido zoledrônico, preenchidos com vidro bioativo S53P4 e aplicação com laser de baixa potência. Para tanto, 24 ratas adultas (*Rattus norvegicus albinus*, *Wistar*) foram submetidas à confecção cirúrgica de dois defeitos nos ossos parietais com 5 mm de diâmetro, distribuídas nos grupos: Grupo **AZC** – coágulo sanguíneo; Grupo **AZL** – coágulo sanguíneo com laser; Grupo **AZBIO** – vidro bioativo; Grupo **AZBIOL** – vidro bioativo com laser. O ácido zoledrônico foi administrado em 5 doses de 0,035 mg/Kg, com intervalo de duas semanas entre elas previamente a cirurgia. Após os períodos de 14 e 28 dias, os animais foram eutanasiados. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística com $p < 0,05$. Quanto a formação óssea, aos 14 dias os grupos **AZBIO** ($52,15 \pm 9,77$) e **AZBIOL** ($49,77 \pm 13,58$) mostraram maiores valores ($p < 0,001$) comparados aos grupos **AZC** ($23,35 \pm 10,15$) e **AZL** ($23,32 \pm 8,75$). No período de 28 dias, houve diferença estatística ($p = 0,048$), sendo o grupo **AZBIO** ($80,24 \pm 5,41$) maior em relação aos grupos **AZC** ($59,59 \pm 16,92$) e **AZL** ($45,25 \pm 5,41$). Nas células mononucleares, o grupo **AZBIOL** apresentou maior número ($p = 0,048$; $p = 0,01$) comparado ao grupo **AZC** ($15,6 \pm 21,4$; $5,5 \pm 2,88$) aos 14 e 28 dias. Sobre as células polimorfonucleares, aos 14 dias, o grupo **AZBIOL** ($78,3 \pm 60,1$) apresentou resultados elevados ($p = 0,048$) comparado ao **AZC** ($15,6 \pm 21,4$). De forma similar aos 28 dias, o grupo **AZBIOL** ($24,6 \pm 12$) também apresentou resultados elevados ($p = 0,01$) comparado ao **AZC** ($5,5 \pm 2,88$). Na quantificação dos vasos sanguíneos, aos 28 dias, houve diferença estatística ($p = 0,003$), sendo o grupo **AZL** maior em relação aos demais grupos. O uso do biomaterial e laser favoreceu o processo de reparo ósseo em ratas submetidas à terapia com ácido zoledrônico.

Palavras-chave: Bisfosfonatos. Laser. Regeneração Óssea. Vidro Bioativo. Osteonecrose.

ABSTRACT

One of the adjuvant treatments for drug osteonecrosis is laser therapy. S53P4 silica-based bioactive glass with osteoconductive, antibacterial and angiogenic properties could also help in its treatment. Thus, the objective of this study was to evaluate the bone repair process in surgically created critical defects in the calvaria of rats submitted to zoledronic acid therapy, filled with bioactive glass S53P4 and application with low power laser. Twenty-four adult female rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) were submitted to surgical preparation of two 5 mm diameter parietal bone defects, distributed in the following groups: Group **AZC** - blood clot; **AZL** group - laser blood clot; **AZBIO** Group - bioactive glass; **AZBIOL** Group - bioactive glass with laser. Zoledronic acid was administered in 5 doses of 0.035 mg / kg, two weeks apart before surgery. After periods of 14 and 28 days, the animals were euthanized. The data obtained were submitted to statistical analysis with $p < 0.05$. Regarding bone formation, at 14 days the **AZBIO** (52.15 ± 9.77) and **AZBIOL** (49.77 ± 13.58) groups showed higher values ($p < 0.001$) compared to the **AZC** groups ($23.35 \pm 10, 15$) and **AZL** (23.32 ± 8.75). In the 28-day period, there was a statistical difference ($p = 0.048$), with the **AZBIO** group (80.24 ± 5.41) being larger than the **AZC** (59.59 ± 16.92) and **AZL** (45.25 ± 5.41). In mononuclear cells, the **AZBIOL** group presented higher number ($p = 0.048$; $p = 0.01$) compared to the **AZC** group (15.6 ± 21.4 ; 5.5 ± 2.88) at 14 and 28 days. Regarding polymorphonuclear cells at 14 days, the **AZBIOL** group (78.3 ± 60.1) showed high results ($p = 0.048$) compared to **AZC** (15.6 ± 21.4). Similarly at 28 days, the **AZBIOL** group (24.6 ± 12) also showed high results ($p = 0.01$) compared to **AZC** (5.5 ± 2.88). In the quantification of blood vessels at 28 days, there was a statistical difference ($p = 0.003$), with the **AZL** group being larger compared to the other groups. The use of biomaterial and laser favored the bone repair process in rats submitted to zoledronic acid therapy.

Keywords: Bisphosphonates. Laser. Bone Regeneration. Bioactive Glass. Osteonecrosis .

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	9
2 OBJETIVO.....	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4 RESULTADOS.....	27
5 DISCUSSÃO.....	39
6 CONCLUSÃO.....	48
7 REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO A.....	59

1 INTRODUÇÃO

A regeneração óssea guiada (ROG) é uma opção de tratamento bastante consagrada e descrita na literatura. Consiste no princípio da exclusão celular, no caso de defeitos ósseos, favorecendo a osteopromoção sem interferência dos tecidos moles adjacentes. (Pelegrine et al. 2011; Koparal et al. 2016; Sanz-Sanchez. 2015)

Para regeneração óssea guiada, alguns elementos devem estar presentes como uma barreira física que determina o espaço a ser preenchido por osso neoformado e que impeça a invasão de tecidos moles e epitélio no local de reparo (Pontoriero et al. 1988). As membranas absorvíveis de colágeno de longo tempo de degradação podem ser empregadas para esta finalidade, pois além de impedir a migração de células do tecido conjuntivo, a sua antigenicidade naturalmente baixa e elevada biocompatibilidade eliminam a necessidade de uma segunda cirurgia. Menor invasividade cirúrgica e menor risco de eventos adversos, tais como infecções, principalmente quando ocorre a exposição intencional ou acidental da mesma, tornam este tipo de membrana muito interessante para uso clínico (Mardas et al. 2010; EnglerHamm et al. 2011; Barone et al. 2013). Outros fatores como o material de preenchimento a ser utilizado no defeito e a qualidade do leito receptor, de onde provém as células que participarão do processo de reparo, são igualmente importantes. Materiais de enxertia empregados podem apresentar propriedades de osteocondução e osteoindução, favorecendo o processo de reparo. Um destes materiais será estudado neste artigo, o vidro bioativo BAG-S53P4. Em relação ao leito, alterações locais ou de metabolismo ósseo podem prejudicar o processo, como por exemplo o uso crônico de bifosfonatos. É importante compreender a dinâmica de reparo nestas áreas, na presença de alterações metabólicas e buscarem adjuvantes que possam favorecer ou compensar os efeitos deletérios dos BPs, como a terapia laser.

Os Bisfosfonatos (BPs) são classificados como drogas antireabsorptivas e são utilizados para prevenir e tratar a reabsorção óssea aumentada em doenças esqueléticas (Borromeo et al. 2011; Hanley et al. 2017; Yao et al. 2017). Durante todo o processo de reparo ósseo, os BPs induzem um efeito antiosteoclástico e um efeito relativamente osteoblástico (Abtahi, 2010; Abtahi,

2013). Devido a este deficit metabólico ósseo, o reparo e a substituição natural do esqueleto facial podem ser prejudicados. Um destes efeitos adverso do uso crônico de BPs é a osteonecrose da mandíbula (BRONJ), que pode caracterizar-se pela presença de exposição óssea na região maxilo-facial, associada ou não a processo séptico (Ruggiero et al. 2014). A sua prevalência é baixa (< 0,001%) em pacientes que recebem doses baixas; no entanto, a incidência aumenta para cerca de 5% nos pacientes que recebem altas doses intravenosa (Reid e Cornish, 2012). O ácido zoledrônico (ZA) é um bisfosfonato de 3ª geração (Ayan et al. 2012), utilizado como um agente terapêutico para condições associadas a neoplasias malignas, incluindo hipercalemia e metástases ósseas de tumores tais como o câncer de mama, próstata e pulmão. Contudo, tais fármacos devem ser utilizados com cautela e com indicação de grande vantagem terapêutico visto os riscos osteonecrose da mandíbula (Kolpakova et al. 2017). Já se identificou que o ácido zoledrônico tem influência sobre o desenvolvimento de osteonecrose, reduzindo o número de células na medula óssea por apoptose e diminuição do espaço da medula óssea devido a um maior volume de osso (Vermeer et al. 2017).

O vidro bioativo BAG-S53P4 (**BonAlive**[®] Biomaterials Ltd, Turku, Finland) é um substituto ósseo, constituído em sílica e uma mistura de óxidos (53% de SiO₂, 23% de Na₂O, 20% de CaO e 4% de P₂O₅), com a propriedade única de ser antibacteriano para muitas bactérias aeróbias, anaeróbias e multirresistentes (Drago et al. 2015), utilizado com sucesso no preenchimento de cavidades e defeitos como tratamento de osteomielite (Lindfors et al. 2010; Drago et al. 2013). As propriedades osteocondutoras, angiogênicas e anti-microbianas do material promove uma regeneração óssea confiável em defeitos ósseos grandes em regiões com infecção crônica, resultando em um benefício clínico com melhor prognóstico (Stoor et al. 2017; Lindfors et al. 2010; Drago et al. 2013; Romano et al. 2014). Recentes estudos tem demonstrado que a redução da atividade bacteriana ocorre devido a sua composição química, ou seja, o sódio é lançado da superfície do vidro, induzindo a elevação do pH que é desfavorável para as bactérias. Além disso, os íons (sódio, cálcio, fósforo e silício) aumentam a pressão osmótica da superfície, criando um ambiente hostil para as bactérias, reduzindo o risco de

infecção (Munukka et al. 2008; Lepparanta et al. 2008; Lindfors et al. 2010; Zehnder et al. 2004; Coraça-Huber et al. 2014). Por estas características, emprego deste material de enxertia em casos de uso crônico de BPs poderia evitar o surgimento de focos sépticos, em áreas eventuais de baixo metabolismo.

Já Laser de baixa intensidade (LLLT) é usado na odontologia com a finalidade de reduzir a dor, minimizar o processo inflamatório, acelerar o reparo ósseo e induzir a proliferação de fibroblastos gengivais (Nascimento et al. 2010). Além disso, a laserterapia também pode estimular a angiogênese, acelerar a reabsorção de partículas no interior dos defeitos ósseos, aumentar a atividade osteoblástica e osteoclástica (Cunha et al. 2014; Barbosa et al. 2013; Nicolau et al. 2003). Por este motivo, a laserterapia foi também analisada sistematicamente como uma potencial abordagem para gestão de osteonecrose da mandíbula (Khan et al. 2015). Recentes estudos concluíram que uma possível melhora na densidade óssea pode ser encontrada quando a laserterapia é aplicada no pós-operatório em defeitos ósseos na região maxilofacial, promovendo também efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, maior rapidez na cicatrização e melhora da qualidade de vida relacionada a saúde bucal. (Santinoni et al. 2017; Bosco et al. 2016).

Assim, com base na escassez de estudos que discutem cuidados e alternativas de materiais para enxerto ósseo em pacientes usuários de terapia crônica com BPs, justifica-se a realização desta pesquisa. Nesta serão analisadas as repercussões do uso de dois meios distintos: o vidro bioativo **BonAlive**[®] como material de preenchimento e a terapia LASER como adjuvante no processo de reparo. Do entendimento do comportamento biológico destes fatores, pode-se buscar alternativas no campo da reconstrução tecidual óssea, tanto nas especialidades de cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial quanto na Implantodontia.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar o processo de reparo em defeitos ósseos criados cirurgicamente na calvária de ratas ovariectomizadas, tratadas com ácido zoledrônico associado a LASER (terapia de baixa potência) e Plasma Rico em Fibrina, por meio da análise histológica, histométrica, imunohistoquímica e microtomográfica. Cento e noventa e duas ratas fêmeas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com aproximadamente 300 gramas, serão incluídos na pesquisa experimental. Os animais serão distribuídos em 2 grupos: Metade dos animais (96 ratas) serão submetidos à ovariectomia bilateral (grupo OVX) e o restante (96 ratas) sham ou falsa ovariectomia, para simulação do estresse cirúrgico (grupo SHAM). Após o procedimento cirúrgico de ovariectomia e sham, os animais serão alocados em 8 sub-grupos (12 animais/grupo) dentro de cada grupo (OVX e SHAM). Dentro cada grupo OVX/SHAM, metade dos animais (48 ratas) serão submetidos terapia com Ácido Zoledrônico via endovenosa, (grupo AZ), sendo uma aplicação a cada 15 dias. O restante (48 ratas) serão submetidos terapia com Soro Fisiológico 0,9%, (grupo SF), via endovenosa para a simulação do estresse da aplicação do ácido zoledrônico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS E LOCAL DE ESTUDO

O presente estudo foi desenvolvido dentro de um paradigma quantitativo, utilizando o método descritivo e analítico, realizando um estudo *in vivo* em animais, com grupos controle e grupos teste.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração, protocolado sob o CEUA nº 4974081216.

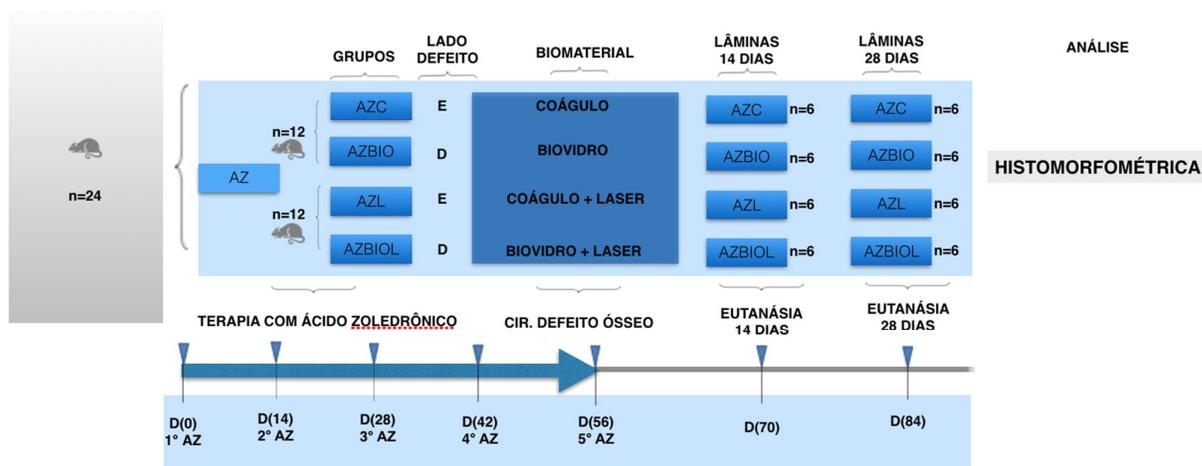
Foram utilizadas 24 ratas fêmeas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com aproximadamente 300 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Sagrado Coração (USC). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, forradas com maravalha branca de pinho autoclavada, trocada três vezes por semana. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram no biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC) - Bauru, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração sem restrição.

AMOSTRA E PROCEDIMENTO PARA APLICAÇÃO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO

Os animais foram submetidos a terapia com ácido zoledrônico, via intravenosa na dose de 0,035 mg/Kg, durante 56 dias, sendo uma aplicação a cada 15 dias, D(0), D(14), D(28) D(42), D(56), totalizando 5 aplicações. Após 56 dias do início da terapia medicamentosa, foi realizado o procedimento cirúrgico para a criação dos defeitos ósseos na calvaria dos animais (HOKUGO et al., 2010) Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (6 animais/grupo), sendo eles o grupo **AZC** - Defeito ósseo preenchido com coágulo sanguíneo, grupo **AZBIO** - Defeito ósseo preenchido com vidro bioativo S53P4 (BonAlive® Biomaterials Ltd, Turku, Finland), grupo **AZL** - Defeito ósseo preenchido com coágulo sanguíneo e submetidos a laserterapia de baixa

potência, grupo **AZBIOL** – Defeito ósseo preenchido com Vidro Bioativo S53P4 (BonAlive® Biomaterials Ltd, Turku, Finland) e submetido a laserterapia de baixa potência. (Figura 1)

Figura 1 - Desenho experimental do estudo



Fonte: Elaborado pela autora.

DESCRIÇÃO COMERCIAL DO VIDRO BIOATIVO S53P4 (BONALIVE®)

BonAlive® é um substituto ósseo estéril pronto para o uso, indicado para o preenchimento de lacunas e cavidades ósseas. Ele pode ser colocado diretamente ao defeito ósseo sem necessidade de mistura ou preparação. BonAlive® é feito de grânulos de vidro Bioativo S53P4 e um ligante sintético solúvel em água. O componente de vidro Bioativo do BonAlive® consiste somente em elementos existentes naturalmente no corpo (Si, Na, Ca, P) sendo utilizado comercialmente há mais de 20 anos. Após a implantação, o material ligante sintético é absorvido, restando somente o vidro bioativo, permitindo a infiltração de tecido entre os grânulos para regeneração óssea. (Disponível em: <http://www.bonalive.com/products/bonalive-putty/>. Acesso em: 23 de agosto de 2017)

DESCRIÇÃO COMERCIAL DA MEMBRANA BIOABSORVÍVEL DE COLÁGENO (LUMINA-COAT®)

LUMINA-COAT® é uma membrana orgânica natural derivada da estrutura óssea bovina desmineralizada, composta basicamente por colágeno tipo I, cujo propósito de aplicação clínica é servir como barreira em cirurgias de enxertia óssea, nas quais são exigidas regenerações teciduais provenientes de anomalias e/ou perdas de tecidos ósseos e/ou conjuntivo. (Disponível em: <https://www.criteria.com.br/lumina-coat>. Acesso em: 23 de agosto de 2017)

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Todos os animais foram pesados em balança digital de precisão (Biotecmed®, São Paulo, Brasil), imediatamente antes de qualquer procedimento cirúrgico, para quantificação correta da dosagem de anestésico e avaliação do ganho de peso durante o experimento.

Sedação dos animais

Os animais foram submetidos à sedação por meio de injeção intramuscular do anestésico Ketamina a 1% (Francotar, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil) associado ao sedativo Cloridrato de Xilazina a 2% (Virbaxyl 2%, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil), sendo a dosagem recomendada pelo fabricante.

Tricotomia

Após comprovada a sedação do animal, este foi colocado em posição ventral sobre uma superfície rígida e fixa (mesa cirúrgica) para que fosse feita a tricotomia com lâminas de barbear esterilizadas na região respectiva aos ossos parietais.

Infiltração Local e Hemostasia

A área a ser operada foi infiltrada com anestésico local por meio de cloridrato de mepivacaína (0,3 ml/Kg, Scandicaine 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) não excedendo 0,9 ml/Kg de peso corporal do animal. A aplicação foi realizada lentamente, tendo a finalidade de promover a hemostasia no transcirúrgico e analgesia trans e pós-operatória imediata.

Incisão

Após realizada a tricotomia, foi feita a antissepsia da pele com Gluconato de clorexidina degermante (2%).

Na região do crânio correspondente aos ossos parietais, foi realizada uma incisão de aproximadamente 2,0 cm com direção pósterio-anterior correndo sobre a linha mediana aos ossos parietais (Figura 2). Esta incisão foi em único plano por meio de lâmina 15 (Feather Industries Ltda, Tóquio, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha).



Figura 2 – Incisão sobre a linha mediana dos osso parietais

Fonte: Elaborado pela autora.

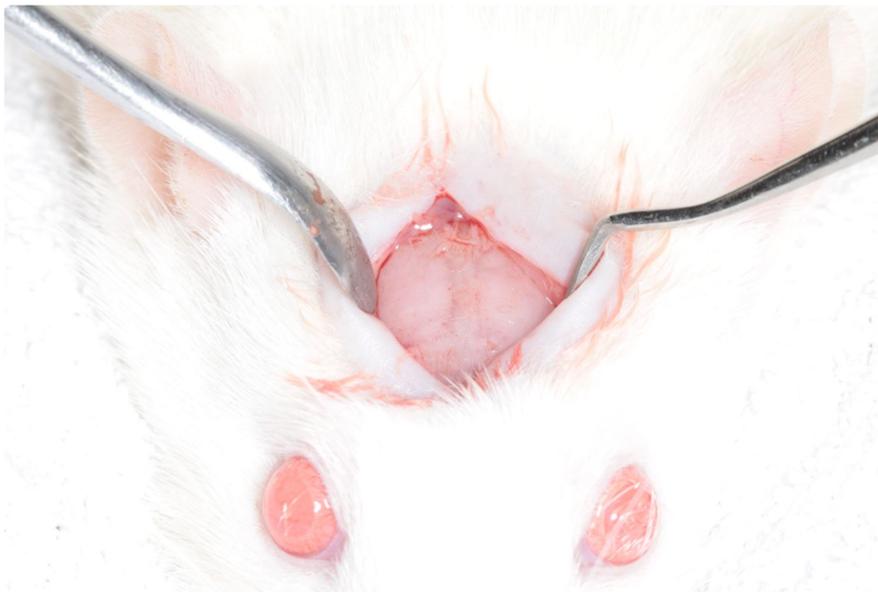
Divulsão e Descolamento dos Tecidos

Após a incisão em plano único, os tecidos foram descolados com o auxílio de um sindesmótomo delicado, permitindo acesso à cortical óssea na região dos ossos parietais.

Afastamento dos Tecidos

O afastamento dos tecidos foi realizado de forma delicada, permitindo uma adequada visualização do campo sem promover traumatismo tecidual. (Figura 3)

Figura 3 – Afastamento dos tecidos

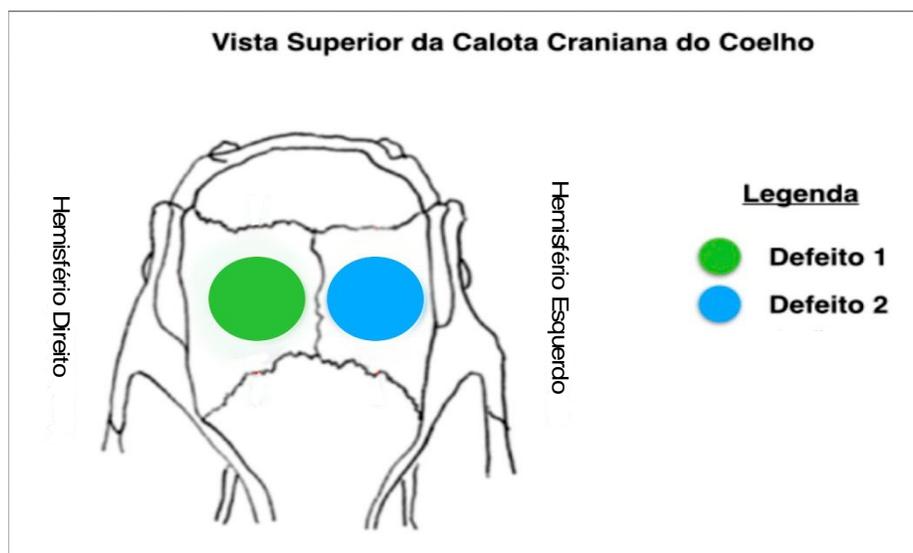


Fonte: Elaborado pela autora.

Ostectomias

Após a exposição dos ossos parietais, foram realizadas as ostectomias na calota craniana para confecção dos defeitos ósseos. (Figura 4)

Figura 4 - Desenho esquemático da anatomia do crânio do rato ilustrando a disposição dos defeitos ósseos criados cirurgicamente (defeito 1 - coágulo, defeito 2 – vidro bioativo)



Fonte: Elaborado pela autora.

Os defeitos ósseos foram confeccionados de forma bi-cortical (envolvendo a cortical externa e interna do crânio), criados cirurgicamente 02 defeitos ósseos de 5,0 mm de diâmetro cada, sendo 01 defeito em cada hemisfério craniano por meio da utilização de uma broca trefina de 5,0 mm de diâmetro (Neodent[®], Curitiba, PR, Brasil) acoplada ao contra-ângulo (NSK SG20, 20:1, Tóquio, Japão) em motor elétrico para implantes (NSK Surg XT Plus, Tóquio, Japão) à velocidade de 800 rpm sob irrigação copiosa com solução fisiológica a 0,9% durante toda a ostectomia. (Figura 5)

Figura 5 - Defeitos ósseos de 5,0 mm de diâmetro



Fonte: Elaborado pela autora.

Procedimento para aplicação do Bonalive®

O BonAlive® foi aplicado no lado direito do defeito ósseo com o auxílio de um instrumental cirúrgico, preenchendo toda a extensão do defeito, sendo o lado esquerdo preenchido apenas com o coágulo.

Procedimento para aplicação do Laser

Imediatamente após a criação e preenchimento do defeitos ósseos, os animais dos grupos com laserterapia foram submetidos a irradiação com laser arseneto de gálio alumínio (ArAlGa), (Photon Laser, DMC, São Carlos, São Paulo, Brazil), com comprimento de onda de 660 nm, tamanho do ponto de 0,07 cm², potência de 0,03 W durante 133 segundos por ponto, irradiância de 0,42 W/cm² e energia de 4 J / ponto (57,14 J/cm²/point). A área recebeu um total de energia

de 32 J. A aplicação foi realizada na região central e em sete pontos na periferia do defeito ósseo. (GARCIA et al., 2013)

Procedimento para colocação da Membrana Bioabsorvível

A membrana Lumina-coat[®] foi colocada após a formação do coágulo no defeito ósseo esquerdo e preenchimento do defeito ósseo direito com o substituto ósseo, com o objetivo de ser uma barreira a invasão de células fibroblásticas e epiteliais para o interior dos defeitos críticos. (Figura 6)

Figura 6 – Posicionamento da membrana recobrendo os defeitos ósseos



Fonte: Elaborado pela autora.

Cuidados Com a Ferida Operatória

Os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos simples, obtendo-se o fechamento primário

da ferida. Após a sutura, foi realizada a antissepsia da área com Gluconato de clorexidina degermante (2%). (Figura 7)

Figura 7 - Sutura



Fonte: Elaborado pela autora.

Cuidados Pós-Operatório

No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (0,1mL/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e dipirona sódica no pós operatório tardio totalizando 3 doses (1mg/kg/dia, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil). Nenhuma restrição alimentar ou de movimentação foi imposta aos animais, os quais foram mantidos em caixas, cada uma com três animais, durante todo experimento.

Eutanásia dos Animais

Os animais foram submetidos à eutanásia por meio da inalação excessiva de gás isoflurano 14 e 28 dias após o procedimento cirúrgico para criação dos defeitos ósseos.

Coleta das Amostras

Comprovada a eutanásia, os animais foram colocados em posição de decúbito ventral sobre uma mesa cirúrgica, sendo realizado o acesso à calota craniana seguindo o mesmo protocolo de acesso cirúrgico utilizado no momento da confecção dos defeitos ósseos. Com uma broca cirúrgica 702 a porção da calota craniana contendo os defeitos ósseos foi removida, mantendo uma margem de um milímetro de tecido ósseo ao redor de toda a extensão do defeito. Na porção anterior da peça, distante dos defeitos ósseos, foi realizada uma marcação com a broca 702, afim de padronizar a posição da peça durante o processo de inclusão em bloco de parafina. Após, as peças foram imersas em solução de formalina neutra tamponada à 10% por 48 horas.

Procedimento Histológico

O preparo das peças a serem avaliadas histologicamente foi realizado no Laboratório de Histopatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Sagrado Coração.

As amostras das calvárias, contendo a região dos defeitos ósseos, foram removidas e imersas em formalina neutra tamponada a 10%, durante 48 horas. Em seguida, foi realizada a descalcificação das mesmas em ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) a 5% por 20 dias, com duas trocas feitas no intervalo de 10 dias. Finalizado o processo de descalcificação, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas e diafanizadas. Já em estado plástico, foi realizada, utilizando-se uma lâmina para micrótomo, uma secção na porção central de cada defeito ósseo, seguindo uma linha imaginária que cruza sua porção central no sentido anteroposterior, dividindo assim cada defeito ósseo em duas metades iguais. Cada uma destas peças, a seguir, foi processada conforme protocolo para inclusão em parafina e coloração por meio de Hematoxilina e Eosina (HE) além do Tricômio de Masson. Assim, permitiu-se a realização de três cortes histológicos contíguos com espessura de 5µm

em um micrótomo (Leica RM 2145, Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha) a partir da secção longitudinal mediana, dispostos em sequência em uma lâmina de vidro que foi codificada para que o observador se mantivesse “cego” quanto a distribuição e análise dos grupos de estudo.

A partir dos blocos de parafina contendo porções de calvárias, foram obtidos cortes longitudinais de 5µm de espessura. Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina e Tricrômio de Masson, e posteriormente foram utilizados para a análise das características do tecido ósseo neoformado, características e condições do biomaterial, presença ou ausência e tipo do infiltrado inflamatório

O campo histológico a ser analisado foi toda a extensão do defeito crítico, no aumento de 40x para análise do infiltrado inflamatório e no aumento de 20x para análise do processo de reparo ósseo, com uma resolução de 300 dpi em microscópio binocular, totalizando cinco regiões analisadas

Análise Morfológica Microscópica

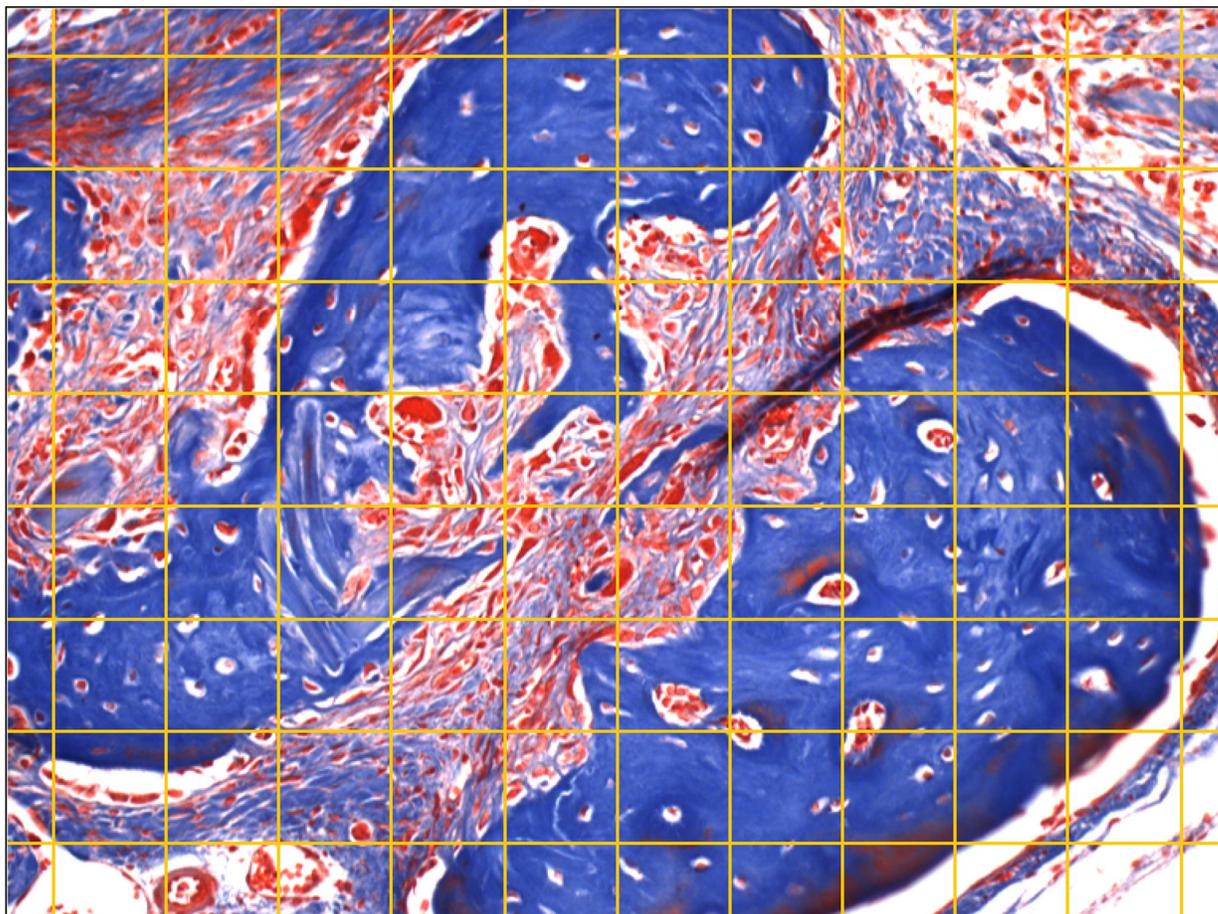
A análise morfológica microscópica foi feita em toda a extensão do defeito crítico nas lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina e Tricrômio de Masson, considerando as características do tecido ósseo neoformado, presença ou ausência do biomaterial e tipo do infiltrado inflamatório pela presença de células mononucleares (MN), polimorfonucleares (PMN), células gigantes e vasos sanguíneos.

Análise Histomorfométrica do Tecido Ósseo

Para a análise histomorfométrica do tecido ósseo, as lâminas foram coradas com Tricrômio de Masson e divididas em cinco regiões que abrangeram toda a extensão do defeito crítico, sendo as regiões A,B,C,D e E. As imagens foram analisadas em um aumento de 20x capturadas através de uma câmera de vídeo fotomicroscópio (Nikon Eclipse 80i, Nikon Instruments INC. 1300 Walt Whitman Road, Melville, NY 11747-3064, USA CÂMERA: QIMAGING Micropublisher 3.3 Cooled, RTV 19535 56th Avenue, Suite 101 Surrey, BC, Canada www.qimaging.com) com auxílio do programa Image-Pro

Plus® (Versão 5.1.2 para Windows XP Media Cybernetics, INC. 8484 Georgia Avenue, Suite 200, Silver Spring, MD 20910 USA), sendo salvas todas as imagens para posterior análise cuidadosa de todas as estruturas e tecidos presentes, sendo feita por um único examinador. A formação do tecido ósseo presente na região do defeito ósseo foi quantificada utilizando o programa Image J. Cada campo foi mapeado com uma grade, ferramenta do programa, onde as linhas se cruzaram formando um quadrado de 0.10 polegadas, num total de 108 quadrados por campo, para cada área analisada. Em cada quadrado, os tecidos foram identificados e contados, sendo eles partículas do biomaterial, osso neoformado e tecido mole (Figura 8). Após a obtenção dos valores em cada corte histológico, os grupos foram reagrupados a partir de sua codificação e seus valores foram submetidos à análise estatística

Figura 8 – Posicionamento da grade para quantificação do tecido ósseo, corado com Tricrômio de Masson em um aumento de 20X.



Fonte: Elaborado pela autora.

Análise Histomorfométrica do Infiltrado Inflamatório

A análise histomorfométrica do infiltrado inflamatório através das lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina foi feita pela contagem do número de células mononucleares, polimorfonucleares, células gigantes e vasos sanguíneos presentes em toda a extensão do defeito. Um total de 5 campos diferentes da região do defeito ósseo de cada espécime foram capturados e examinados em aumento de 40X (Microscópio Nikon, Eclipse 80i. Japão) (Figura 9). A contagem das células foi realizada com o auxílio do software Image J (National Institutes of Health) (MADA et al., 2017). A soma dos cinco campos correspondeu ao número total de cada estrutura analisada, que serão submetidas a análise estatística.

Figura 9 – Morfometria das 5 regiões, totalizando a área do defeito crítico



Fonte: Elaborado pela autora.

Análise Estatística

Para avaliar possíveis diferenças intragrupos (grupos avaliados em diferentes períodos pós-operatório - 14 e 28 dias), os dados foram submetidos ao teste estatístico de Komogorov Smirnov para verificar se estavam dentro da normalidade. Observou-se que os dados mensurados eram não-paramétricos, dessa maneira, o teste estatístico de Mann-Whitney foi utilizado, empregando-se o nível de significância de 5%.

Para avaliar possíveis diferenças intergrupos (comparação entre os grupos estudados), os dados foram submetidos ao teste estatístico de Komogorov Smirnov para verificar se estavam dentro da normalidade. Os testes estatísticos empregados foram o Kruskal-Wallis e ANOVA, complementados pelo teste de Student-Newman-Keuls.

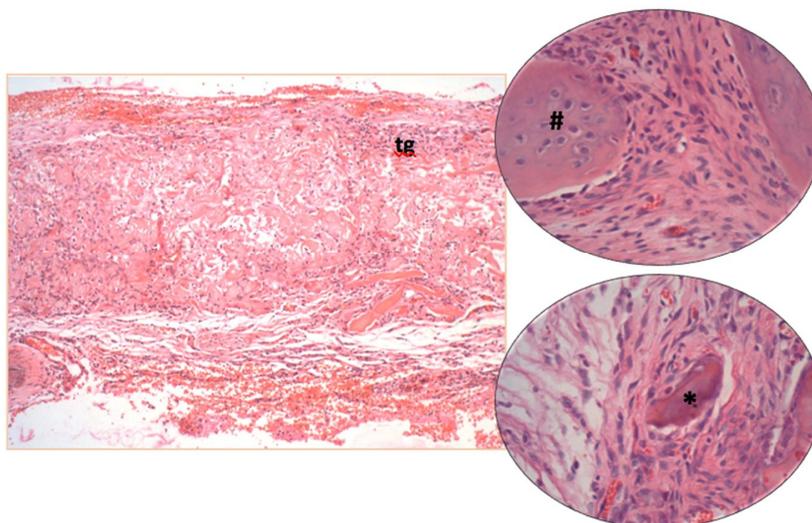
Todos os testes estatísticos foram avaliados ao nível de significância de 5% ($p < 0.05$) e foram aplicados através do programa SigmaStat 3.2.

4 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foram baseados somente em informações obtidas a partir de dados de amostras consideradas válidas. Para tanto, foram considerados válidos para obtenção de amostras todos os animais que ao final do seu período experimental estavam vivos, sem sinais clínicos de adoecimento. Assim, dos 24 animais utilizados no estudo, todos foram considerados aptos para obtenção das amostras, não ocorrendo óbitos precoces e perda das amostras.

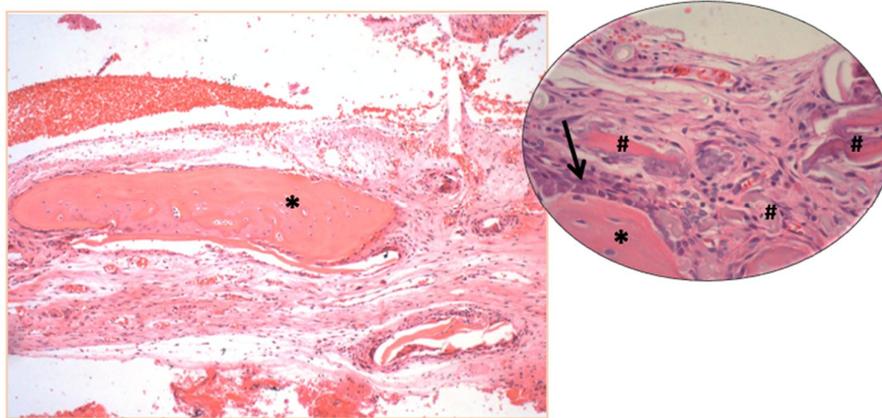
Os resultados obtidos foram descritos após a análise qualitativa das seguintes estruturas do defeito ósseo: bordas do defeito, morfologia do tecido ósseo neoformado, características do tecido conjuntivo (disposição e organização celular), tipo de infiltrado inflamatório e remanescente do substituto ósseo após 14 e 28 dias pós-operatórios.

Figura 10 – Grupo **AZC** 14 dias - Região central do defeito ósseo preenchido por tecido de granulação (tg), fibras colágenas, fragmentos não viáveis de tecido ósseo (*) e neoformação óssea nas margens do defeito (#). Aumento de 10x e 20x. HE



Fonte: Elaborado pela autora.

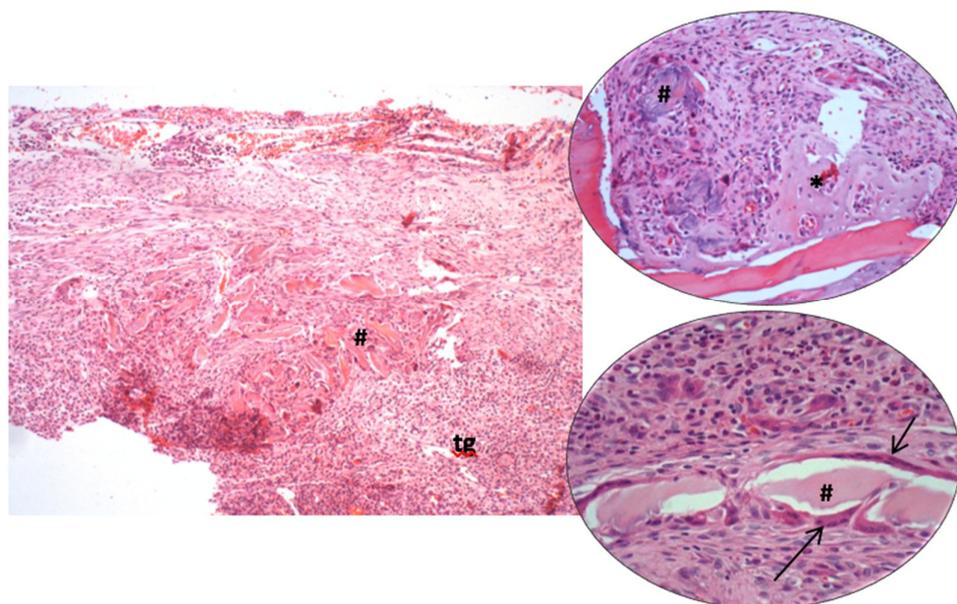
Figura 11 – Grupo **AZC** 28 dias – Neoformação óssea na região marginal do defeito (*), margeada por células osteoblásticas (seta), em meio a tecido conjuntivo e partículas de osso não viável (#). Aumento de 10x e 20x. HE



Fonte: Elaborado pela autora.

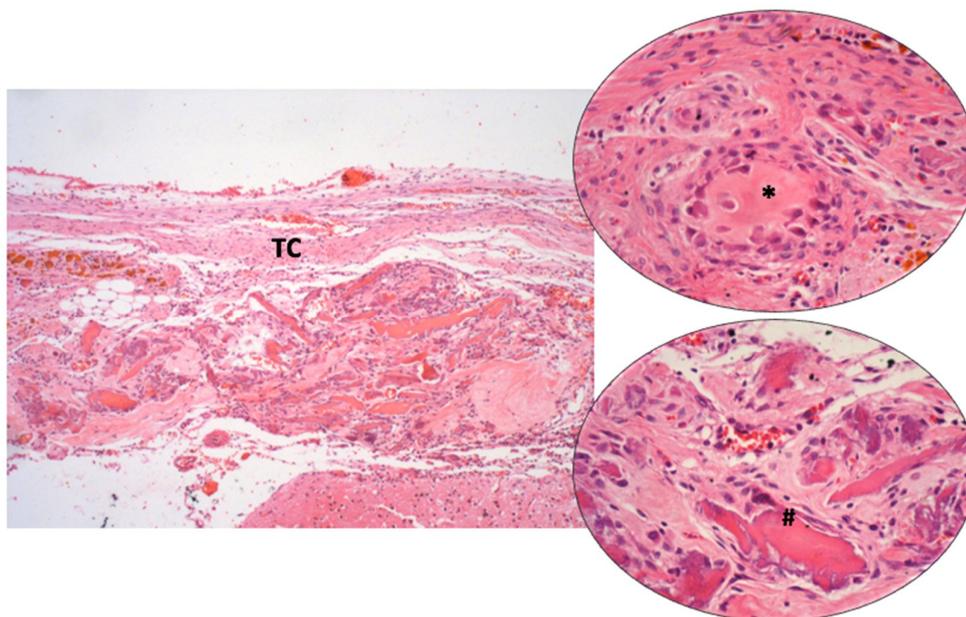
Grupo AZL (coágulo e laser) – Aos **14 dias** observou-se tecido ósseo neoformado nas extremidades do defeito. Na região central, tecido de granulação ricamente vascularizado e celularizado, com predomínio de infiltrado inflamatório mononuclear, moderado número de PMN e poucas células gigantes margeando fragmentos ósseos não viáveis (Figura 12). Aos **28 dias**, tecido conjuntivo ocupando a região central do defeito, apresentando infiltrado inflamatório mononuclear, poucos PMN e células gigantes ao redor de tecido ósseo não viável (Figura 13).

Figura 12 – Grupo **AZL** 14 dias – Neoformação óssea nas margens do defeito (*). Na região central, há a presença de tecido de granulação (tg) e fragmentos de tecido ósseo não viável (#), envolvidos por células gigantes (setas). Aumento de 10x e 20x. HE



Fonte: Elaborado pela autora.

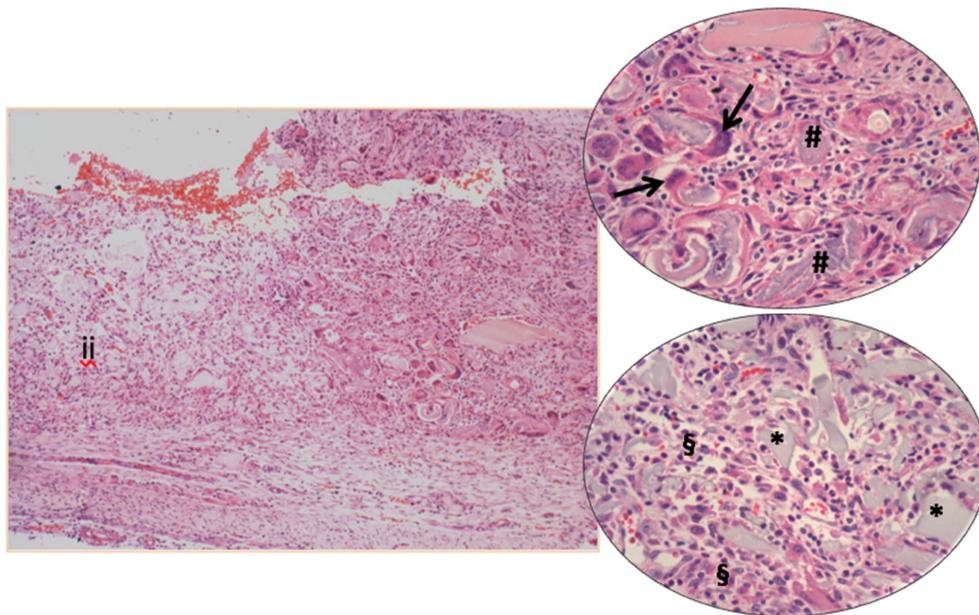
Figura 13 – Grupo **AZL** 28 dias – Região central do defeito preenchida por tecido conjuntivo (TC), poucas áreas de neoformação óssea (*) e fragmentos de tecido ósseo não viável (#). Aumento de 10x e 20x. HE



Fonte: Elaborado pela autora.

Grupo AZBIO (biomaterial) – No período de **14 dias** houve neoformação de tecido ósseo nas margens do defeito e região central apresentando biomaterial e infiltrado inflamatório com predomínio de mononucleares e moderado número de PMN. Presença de células gigantes predominando ao redor de fragmentos ósseos não viáveis, e algumas margeando o biomaterial (Figura 14). Aos **28 dias** notou-se neoformação óssea nas margens do defeito e região central com a presença de biomaterial encapsulado por tecido conjuntivo, infiltrado contendo predomínio de células mononucleares e moderado número de PMN. Células gigantes presentes ao redor de osso não viável (Figura 15).

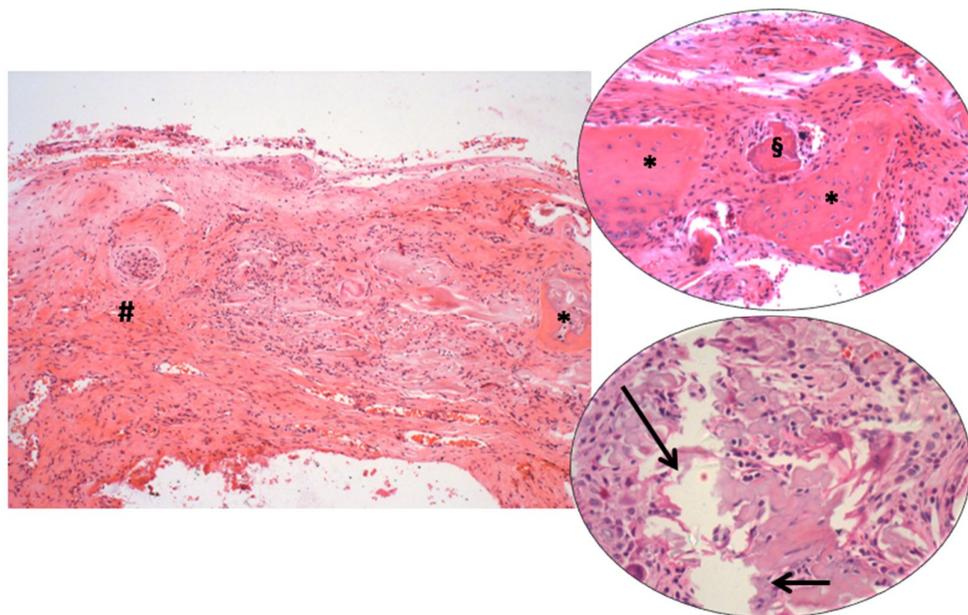
Figura 14 – Grupo **AZBIO** 14 dias – Área central do defeito com intenso infiltrado inflamatório (ii), formado por células predominantemente mononucleares (§) margeando partículas do biomaterial (*) e fragmentos de tecido ósseo não viável (#). Presença de grande quantidade de células gigantes ao redor do tecido ósseo não viável (setas). Aumento de 10x e 20x.



HE

Fonte: Elaborado pela autora.

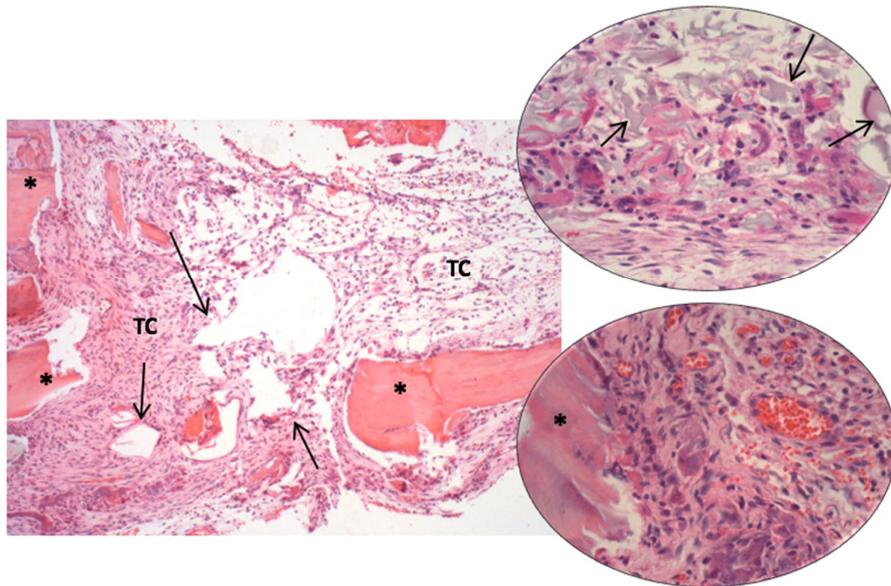
Figura 15 – Grupo **AZBIO** 28 dias - Região central do defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo fibroso (#). Presença de tecido ósseo neoformado (*) na margem do defeito ósseo e áreas adjacentes e presença de osso necrótico (§). Regiões mais centralizadas contendo biomaterial (setas). Aumento de 10x e 20x. HE



Fonte: Elaborado pela autora.

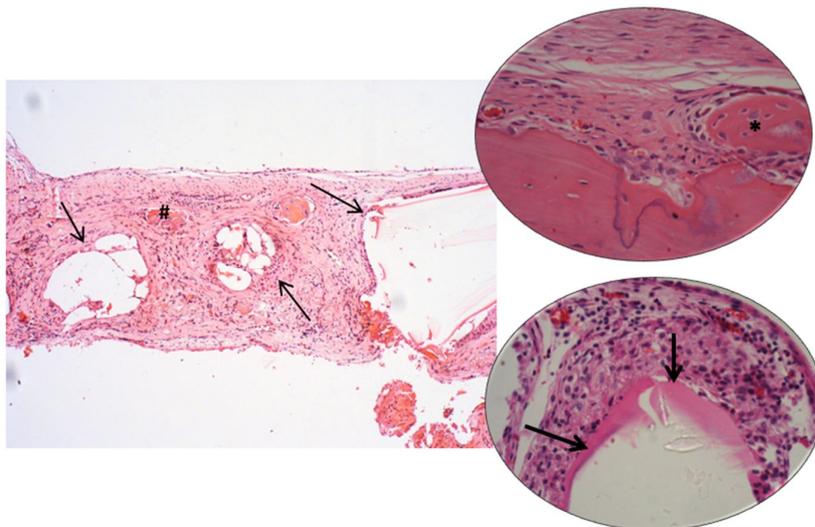
Grupo AZBIOL (biomaterial e laser) – Aos **14 dias** notou-se neoformação de tecido ósseo nas extremidades do defeito e região central contendo algumas partículas do biomaterial rodeado por cápsulas de tecido conjuntivo, infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear e moderado número de PMN (Figura 16). Aos **28 dias**, partículas maiores do biomaterial encapsuladas por tecido conjuntivo, predomínio de células mononucleares e moderado número de PMN. Células gigantes ao redor de fragmentos ósseos não viáveis (Figura 17).

Figura 16 - Grupo **AZBIOL** 14 dias – Presença de biomaterial na área central do defeito (setas), permeado por tecido conjuntivo (TC) e fragmentos de tecido ósseo necrótico (*). Aumento de 10x e 20x. HE



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 17 – Grupo **AZBIOL** 28 dias - Neoformação óssea nas áreas próximas à margem do defeito (*). Região central contendo fragmentos do biomaterial (setas) e de tecido ósseo não viável (#). Aumento de 10x e 20x. HE



Fonte: Elaborado pela autora.

ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

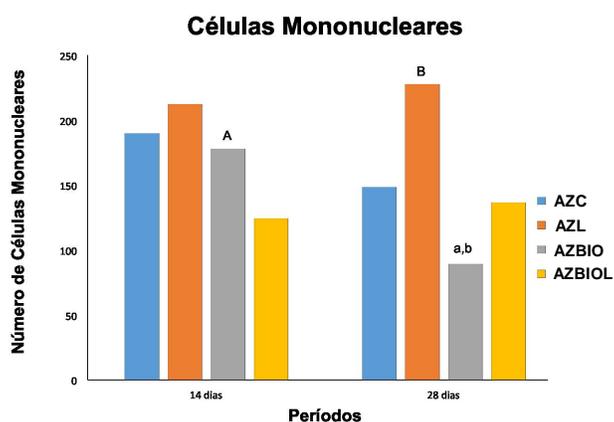
INFILTRADO INFLAMATÓRIO

CÉLULAS MONONUCLEARES

As células mononucleares, na comparação intragrupos, não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos grupos **AZC** ($p=0,31$), **AZBIOL** ($p=0,757$) e **AZL** ($p=0,687$). Já o grupo **AZBIO**, apresentou diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 14 e 28 dias ($p=0,01$).

Na avaliação intergrupos, no período de 14 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ($p=0,095$). Já no período de 28 dias, a comparação dos grupos apresentou diferença estatística ($p=0,017$), sendo o grupo **AZL** ($227,6 \pm 34,7$) maior em relação ao **AZBIO** ($89,5 \pm 57,3$). (Apêndice A) (Gráfico 1)

Gráfico 1 – Número de Células Mononucleares, 14 e 28 dias



Fonte: Elaborado pela autora.

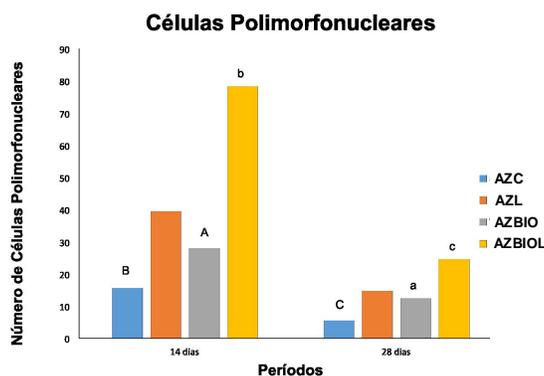
Legenda: Células mononucleares: Diferença estatisticamente significativa intragrupo –a≠A (p=0,01). Na avaliação intergrupo, diferença estatisticamente significativa - 28 dias: B≠b (p=0,017).

CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES

As células polimorfonucleares, na comparação intragrupos, não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos grupos **AZC** (p=0,31), **AZBIOL** (p=0,093) e **AZL** (p=0,18). Já o grupo **AZBIO**, apresentou diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 14 e 28 dias (p=0,01).

Na avaliação intergrupos, no período de 14 dias, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (p=0,048), na qual o grupo **AZBIOL** (78,3 ± 60,1) apresentou resultados elevados comparado ao **AZC** (15,6 ± 21,4). Do mesmo modo no período de 28 dias o grupo **AZBIOL** (24,6 ± 12) apresentou resultados elevados comparado ao **AZC** (5,5 ± 2,88), com valor de p=0,01. (Apêndice B) (Gráfico 2)

Gráfico 2 – Número de Células Polimorfonucleares, 14 e 28 dias



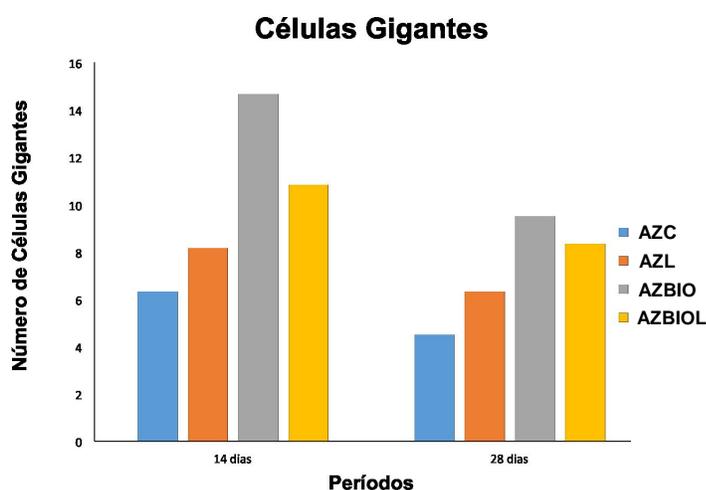
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Células polimorfonucleares: Diferença estatisticamente significativa intragrupo: $a \neq A$ ($p=0,01$). Na avaliação intergrupo, diferença estatisticamente significativa – 14 dias: $B \neq b$ ($p=0,048$). 28 dias: $C \neq c$ ($P=0,01$).

CÉLULAS GIGANTES

As células gigantes, na comparação intragrupos, não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos grupos **AZC** ($p=0,477$), **AZL** ($p=0,589$), **AZBIO** ($p=0,392$) e **AZBIOL** ($p=0,394$). Na avaliação intergrupos também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, nos períodos de 14 dias ($p=0,179$) e 28 dias ($p=0,531$). (Apêndice C) (Gráfico 3)

Gráfico 3 – Número de Células Gigantes, 14 e 28 dias



Fonte: Elaborado pela autora.

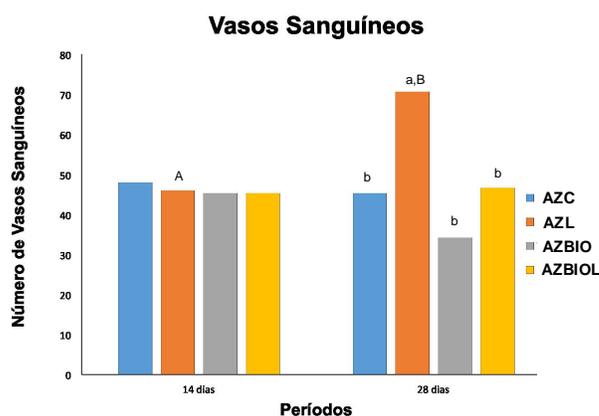
Legenda: Células gigantes: Os resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa intragrupo e intergrupo.

VASOS SANGUÍNEOS

Os Vasos Sanguíneos, na comparação intragrupos, não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos grupos **AZC** ($p=0,805$), **AZBIO** ($p=0,108$) e **AZBIOL** ($p=0,896$). Já o grupo **AZL**, apresentou diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 14 e 28 dias ($p=0,002$).

Na avaliação intergrupos, no período de 14 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ($p=0,986$). Já no período de 28 dias, a comparação dos grupos apresentou diferença estatística ($p=0,003$), sendo o grupo **AZL** ($70,66 \pm 11,29$) maior em relação aos demais grupos. (Apêndice D) (Gráfico 4)

Gráfico 4 – Número de Vasos Sanguíneos, 14 e 28 dias



Fonte: Elaborado pela autora.

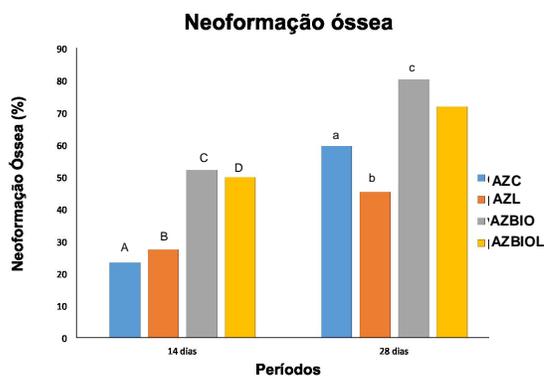
Legenda: Vasos sanguíneos: Diferença estatisticamente significativa intragrupo –a≠A (p=0,01). Na avaliação intergrupo, diferença estatisticamente significativa - 28 dias: B≠b (p=0,003)

NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

Na comparação intragrupos, houve diferença estatisticamente significativa nos grupos **AZC** ($p=0,003$), **AZL** ($p=0,005$) e **AZBIO** ($p\leq 0,001$). Já o grupo **AZBIOL**, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 14 e 28 dias ($p=0,167$).

Na avaliação intergrupos, no período de 14 dias, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p\leq 0,001$). Nesse período, os grupos **AZBIO** ($52,15 \pm 9,77$) e **AZBIOL** ($49,77 \pm 13,58$) mostraram maior formação óssea comparado aos grupos **AZC** ($23,35 \pm 10,15$) e **AZL** ($23,32 \pm 8,75$). No período de 28 dias, a comparação dos grupos apresentou diferença estatística ($p=0,048$), sendo o grupo **AZBIO** ($80,24 \pm 5,41$) maior em relação aos grupos **AZC** ($59,59 \pm 16,92$) e **AZL** ($45,25 \pm 5,41$). (Apêndice E) (Gráfico 5)

Gráfico 5 – Neoformação Óssea, 14 e 28 dias



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Neoformação óssea: Diferença estatisticamente significativa intragrupo: $a \neq A$ ($p=0,003$); $b \neq B$ ($p=0,005$) e $c \neq C$ ($p \leq 0,001$). Na avaliação intergrupo, diferença estatisticamente significativa – 14 dias: $C \neq A$; $C \neq B$; $D \neq A$; $D \neq B$ ($p \leq 0,001$). 28 dias: $c \neq a$; $c \neq b$ ($P=0,048$).

5 DISCUSSÃO

O modelo experimental utilizado neste estudo foi o defeito crítico em calota craniana de ratos (KAZANCIOGLU et al., 2013; BOSCO et al., 2016; DERECI et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2017; MOREIRA et al., 2018), de fácil acesso cirúrgico e qualidade dos tecidos moles circunjacentes. (SCHEMITSCH, 2017) Em uma revisão sistemática, pelo volume de dados relevantes, os defeitos críticos em calvária de ratos foram definidos como defeitos iguais ou maiores que 5 milímetros, diâmetro este utilizado em nosso estudo. (VAJGEL et al., 2014) Também corroborando com dados da literatura, os defeitos críticos de 5 milímetros foram confeccionados bilateralmente na calvária dos animais. (PINO et al., 2017; ZENG et al., 2017; ZHOU et al., 2017)

O ácido zoledrônico é um bisfosfonato de 3ª geração, utilizado como um agente terapêutico para condições associadas a neoplasias malignas, geralmente administrado na forma intravenosa. (AYAN et al., 2012; KOLPAKOVA et al., 2017) Todavia, ainda não há um consenso na literatura em relação a via e forma de aplicação do ácido zoledrônico.

Alguns autores avaliaram o processo de reparo ósseo com a utilização do ácido zoledrônico por via intraperitoneal. (DAYISOYLU et al., 2013; SILVEIRA SOARES et al., 2018) Em contrapartida, outros autores realizaram a aplicação intravenosa, também com variação nos períodos de administração da droga. (HOKUGO et al., 2010; MARINO et al., 2012; CURRA et al., 2016; GÜNES et al., 2016; KÜN-DARBOIS et al., 2018) (Tabela 1)

Quando utilizado em modelos animais experimentais na dose de 0,035 mg/Kg intravenosa na veia caudal a cada duas semanas, totalizando 5 aplicações, os estudos mostraram uma indução da osteonecrose, tornando-se um modelo experimental possivelmente utilizado para este fim. (HOKUGO et al., 2010; CURRA et al., 2016) Sendo assim, foi utilizada essa neste estudo com o objetivo de induzir condições críticas, favoráveis a manifestação clínica de osteonecrose. Isto pode ser evidenciado, pela presença, na análise histológica, de fragmentos ósseos não viáveis, acelulares, infiltrado inflamatório

mono ou polimorfonuclear em toda a extensão do defeito crítico nos períodos de 14 e 28 dias, compatíveis com as características histológicas da osteonecrose medicamentosa, achados esses já relatados por Marx. (MARX e TURSUN, 2012)

A regeneração óssea guiada é uma técnica segura, com evidências de previsibilidade e muito utilizada na reabilitação das estruturas crânio-maxilo-faciais, estando baseada nos conhecimentos da osteopromoção, onde a região a ser reconstruída é mecanicamente isolada de invasão indesejada e interferência de células fibroblásticas e epiteliais, que frequentemente ocupam o defeito a ser reconstruído mais rapidamente que os osteoblastos. (PELEGRINE et al., 2011; SANZ-SÁNCHEZ et al., 2015; KOPARAL et al., 2016) Justificando assim o uso de uma membrana de colágeno em nosso estudo, com o intuito de manter o substituto ósseo no interior do defeito e impedir a interferência de células provenientes do tecido mole circundante.

Inúmeros biomateriais são utilizados como substitutos ósseos na regeneração óssea de defeitos críticos, sendo importante o conhecimento das propriedades físico-químico-biológicas do mesmo para sua correta escolha. (VÄLIMÄKI e ARO, 2006) Neste estudo foi utilizado o vidro bioativo S53P4, que segundo estudos anteriores, se diferencia dos demais por suas propriedades antibacterianas e angiogênicas. É composto por vários compostos iônicos (SiO_2 , Na_2O , CaO , P_2O_5) que quando implantado na cavidade libera íons alcalinos, causando um aumento abrupto no pH, permitindo tanto a inibição do crescimento bacteriano através do desequilíbrio osmótico e ácido-base gerado, não sendo dependente de antibióticos locais. (CORAÇA-HUBER et al., 2014; DRAGO et al., 2014; RAHAMAN et al., 2011; JONES, 2013)

A sua capacidade osteocondutora tem sido demonstrada em diversos estudos científicos anteriores, sendo um substituto ósseo possivelmente utilizado na reparação de defeitos ósseos. (TUUSA et al., 2007; TÖLLI et al., 2010; GUNN et al., 2013; CAMARGO et al., 2015; ZAZGYVA et al., 2015) (Tabela 2) Indo de encontro aos dados de nossa pesquisa, que mostraram uma diferença estatisticamente significativa na neoformação óssea nos períodos de

14 e 28 dias dos grupos preenchidos com o vidro bioativo submetidos a laserterapia (**AZBIOL**) ou não submetidos a laserterapia (**AZBIO**) em comparação com o grupo com coágulo sanguíneo (**AZC**).

Pesquisas realizadas para avaliar o processo de reparo ósseo em defeitos submetidos a laserterapia de baixa potência, são inúmeras na literatura, tanto em modelos experimentais com animais como também em humanos. Vários estudos já realizados mostraram sua capacidade de contribuir para a aceleração no processo de reparo ósseo, sendo também coadjuvantes no tratamento de lesões de osteonecrose medicamentosa. No entanto, não há um consenso na literatura quanto ao protocolo de aplicação do laser a ser utilizado. (GARCIA et al., 2013; BOSCO et al., 2016; DERECI et al., 2016; ATASOY et al., 2017; PINHEIRO et al., 2017) (Tabela 3)

Alguns autores propõem o uso da laserterapia de baixa potência com a finalidade de favorecer o reparo ósseo em calvária de ratos, quando aplicado uma vez ao dia por 120 segundos, 3 dias por semana durante 2 semanas, obtendo com essa terapia resultados positivos, isto é, aumento da neoformação óssea em relação ao grupo sem a terapia com o laser. (KAZANCIOGLU et al., 2013) No entanto, outros autores mostram que quando aplicado apenas uma única vez em 4 pontos na periferia do defeito e 1 ponto no centro do defeito em calvária de ratos no trans-operatório, não se teve um aumento da neoformação óssea comparado ao grupo controle. (MOREIRA et al., 2018)

Quando utilizado em defeitos críticos em calvária de ratos, aplicado em um comprimento de onda de 660 nm, um ponto na região central e em sete pontos na periferia do defeito ósseo, o laser de baixa potência proporcionou uma maior quantidade de área óssea total neoformada quando comparado ao grupo sem a aplicação do Laser. (GARCIA et al., 2013; BOSCO et al., 2016) Justificando assim a metodologia utilizada neste estudo, com a finalidade de avaliar a efetividade desse protocolo por meio da análise histomorfométrica. No entanto, os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa nos períodos de 14 e 28 dias entre o grupo coágulo sanguíneo submetido ou não a laserterapia, no entanto

quando associado ao vidro bioativo percebeu-se uma maior formação óssea nos períodos de 14 e 28 dias.

As células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho (CGM-CE) são encontradas em reações inflamatórias granulomatosas, formadas ao redor de fio de sutura, partículas de carbono e sílica e materiais de difícil absorção, sendo formadas pela fusão de monócitos ou macrófagos. (MÖST et al., 1997; ANDERSON et al., 2008) Neste trabalho, as maiores quantidades de células gigantes foram observadas nos grupos tratados com o vidro bioativo e sua associação com o laser (14 dias), justificadas pela presença do biomaterial utilizado, que contém uma camada rica em fosfato de cálcio e a matriz rica em sílica revestindo a partícula do vidro. Aos 28 dias, embora a maior quantidade destas células ainda sejam predominantes nos grupos tratados, encontram-se diminuídas em relação ao período anterior. Esta característica pode ser atribuída a degradação da camada de revestimento do vidro, que deve estar em processo de atividade.

Além da característica química do revestimento do vidro bioativo S53P4, a grande quantidade de CGM-CE pode ser justificada pelas características irregulares das partículas do biomaterial. Estas características foram observadas por ANDERSON (2000) que relatou que a formação destas células, principalmente quando estão localizadas em área de interface tecido-material, são dependentes da área de superfície. Tecidos utilizados como enxertos vasculares apresentam grande quantidade de CGM-CEs, enquanto superfícies planas como as encontradas em próteses mamárias exibem pequena quantidade de macrófagos e CGM-CE na interface tecido-material.

Ainda no presente estudo, além da presença ao redor das partículas do biomaterial, as CGM-CE foram observadas margeando partículas de osso necrótico. Estes dados são claros quando observados os grupos que tiveram o defeitos ósseo preenchido por coágulo, associado ou não ao laser, nos dois períodos de análise. Baseando-se nas características de formação deste tipo celular, não seria um local comum de seu achado, uma vez que o tecido ósseo, mesmo necrótico, deveria ser reabsorvido por macrófagos. O estudo de Yoshioka e colaboradores, mostrou que a administração de zoledronato afetou

as características do tecido ósseo, causando excesso de mineralização, deterioração da qualidade mineral óssea, diminuição do conteúdo de proteoglicanas e degradação da integridade estrutural do colágeno. (YOSHIOKA et al., 2018) Estas alterações estruturais produzidas pelo medicamento, que neste estudo foi administrado a todos os animais, poderiam ter induzido a uma modificação no comportamento dos osteoclastos, levando a uma identificação destes fragmentos como corpo estranho. Além das modificações na estrutura óssea causada pelo ácido zoledrônico, os macrófagos são afetados pelo medicamento, impossibilitando a formação de um microambiente adequado para a atividade reabsortiva, mantendo os fragmentos ósseos presentes por mais tempo e induzindo uma resposta inflamatória mediada por CGM-CE. (KIMMEL, 2007)

A quantidade de células inflamatórias foi avaliada em ambos os períodos analisados. Notou-se que em todos os grupos houve uma resposta inicial com polimorfonucleares em maiores quantidades aos 14 dias, diminuindo aos 28 dias. O grupo que utilizou o vidro bioativo apresentou maior quantidade de PMN que aquele tratado com coágulo, diferente estatisticamente. Esta resposta é contrária a outros estudos onde mostraram que os animais tratados com o biomaterial tiveram menores graus de infiltrado inflamatório em relação ao grupo sem tratamento. Também o grupo tratado com laser associado ao vidro bioativo apresentou uma resposta neutrofílica intensa aos 14 dias, diminuindo aos 28 dias, permanecendo maior neste período, que nos demais grupos. (VÄLIMÄKI e ARO, 2006; CAMARGO et al., 2015)

Foi observado, neste estudo, predominância no número de células mononucleares nos períodos estudados (14 e 28 dias), em todos os grupos analisados. Estes resultados estão de acordo com MATSUMOTO (2017) que observou estes mesmos parâmetros, tanto nos ratos tratados com o ácido zoledrônico, como no grupo controle. Assim, esta característica inflamatória não pode ser atribuída à administração do ácido zoledrônico a todos os grupos deste estudo. Ao longo do tempo, nota-se que não há diminuição significativa destas células, embora aos 28 dias há maior quantidade de MN no grupo

coágulo associado ao laser, quando comparado ao tratamento com vidro bioativo.

Foi observado que o laser promoveu uma diminuição significativa de PMN entre o período de 14 e 28 dias, somente no grupo em que esteve associado ao vidro, mas o mesmo não ocorreu com relação as MN. Quando o laser foi associado ao coágulo, não houve diferença entre os períodos, com relação aos dois tipos celulares.

Estudos anteriores *in vitro* e *in vivo* mostraram que o vidro bioativo S53P4 possui propriedades angiogênicas, podendo estimular a secreção de fibroblastos e liberação de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) em diferentes concentrações e diferentes tamanhos de partículas. (ORÉFICE et al., 2009; DETSCH et al., 2014) A liberação de íons, especialmente o Ca^{2+} , que ocorre na superfície do vidro, pode participar da via de sinalização do VEGF, promovendo a angiogênese e a formação óssea. (GERHARDT et al., 2011; DETSCH et al., 2014) Contrariando estes resultados, em nosso estudo verificamos que o número de vasos sanguíneos não foi diferente entre os grupos tratados com o coágulo e o vidro bioativo, tanto aos 14 como aos 28 dias. Estes dados mostraram que talvez os íons liberados pelas partículas de vidro não sejam suficientes para induzir a formação de novos vasos sanguíneos.

Por outro lado, a osteonecrose induzida por bisfosfonatos gera um comprometimento da vascularização, podendo ser explicada pelo efeito antiangiogênico da medicação via inibição da expressão de VEGF. Estudos realizados em camundongos revelaram que o ácido zoledrônico, um bisfosfonato contendo nitrogênio, suprime a expressão de MMP-9 pela infiltração de macrófagos, diminuindo a ligação do VEGF ao seu receptor em células endoteliais angiogênicas. (FERRETTI et al., 2005; TANG et al., 2010; KÜN-DARBOIS et al., 2018) Embora não tenha sido verificada a expressão de proteínas relacionadas à angiogênese em nosso estudo, foi observado que o tratamento realizado com bisfosfonato, em todos os grupos deste estudo, manteve um padrão constante no número de vasos sanguíneos,

independentemente do tratamento estabelecido para o defeito ósseo. Talvez esta diferença fosse notada em relação a animais que não tivessem utilizado o medicamento.

O laser de baixa potência apresenta propriedades angiogênicas, acelera a reabsorção de partículas no interior dos defeitos ósseos e aumenta a atividade osteoblástica e osteoclástica. (BARBOSA et al., 2013; CUNHA et al., 2014) Estas características de modificação no padrão da angiogênese foram observadas em nosso estudo, relacionada ao tratamento do grupo coágulo e laser, aos 28 dias. Neste período nota-se um aumento no número de vasos sanguíneos, estatisticamente diferente dos demais grupos, mas esta diferença não foi observada quando o laser foi utilizado associado ao vidro bioativo, que se manteve semelhante aos demais grupos, nos dois períodos de análise. Assim, pode-se deduzir que o vidro bioativo pode ter minimizado as propriedades do laser.

Tabela 1: Estudos que avaliaram o reparo ósseo em animais submetidos ao ácido zoledrônico

Autor/ Ano	Modelo Experimental	Dose de Aplicação	Tempo Aplicação Ácido	Eutanásia	Análise Realizada	Conclusão
DAYISOYLU 2013	Ratos/ Extração Molares	Z.A 0.1 mg/kg Hormônio Paratireóide I.P	3x semana Durante 8 semanas (Antes do procedimento)	16 semanas	Histomorfométrica	O hormônio Paratireóide associado ao Z.A mostrou uma melhora significativa na cicatrização, ressalva a osteonecrose nos grupos utilizados o Z.A
Conte 2016	Ratos/ Extração Dentária	Z.A 1 mg / kg S.C	1 dose semanal durante 60 dias	28 dias após extração	Histológica Estereométrica Radiológica	Associação do Z.A com a extração dentária foi capaz de induzir lesões de osteonecrose em roedores
Marino 2012	Ratos/ Extração Dentária	Z.A 0.2mg/ kg I.V	No início do estudo e 3 semanas após	Momento da cirurgia 4 e 8 semanas após	Histológica Microtomográfica	Os modelos apresentaram seqüestro ósseo e necrose com lacunas vazias, infiltrado celular inflamatório misto
Curra 2016	Ratos/ Extração Dentária	Z.A 0.035mg/ kg I.V	A cada 2 semanas em 8 semanas antes da cirurgia	14,28 e 42 dias	Histológica Microtomografia computadorizada	Osteonecrose no maxilar em 40% dos animais
Dundar 2016	Coelhos/ Calvária	Z.A 0.1mg/kg	Aplicação local misturado com o sangue e biomaterial	3 meses	Histomorfométrica	Z.A local associado ao sangue autogênico e material de enxerto é mais eficaz do que o uso de apenas sangue e enxerto
Günes 2016	Ratos/ Calvária	Z.A 1 mg/ml local Z.A 0,1 mg/kg I.V	Uma aplicação sistêmica em um grupo e misturado localmente com o biomaterial no outro grupo	7,14 e 28 dias	Histológica Histomorfométrica	Formação óssea aumentada em comparação com os grupos que não tiveram o uso do Z.A
Dundar 2017	Ratos/ Distração Osteogênica em mandíbula	Z.A 0,1mg/kg	Uma única aplicação sistêmica antes do procedimento	4 semanas	Histomorfométrica Imunohistoquímica	Efetivo melhorando a neoformação óssea no espaço de distração osteogênica em mandíbulas de ratos
Kün-Darbois 2018	Ratos/ Extração Molares	Z.A 0.1 mg/kg I.V	Uma vez por semana, durante 10 semanas	14 semanas após a primeira aplicação	Micro-espectrometria Microtomografia computadorizada	Aumento mineral na matriz óssea, diminuição da vascularização nos alvéolos após as extrações e também não aumento no teor de cálcio da matriz óssea
Hokugo 2010	Ratos/ Extração Dentária	Z.A 0.035mg/ kg I.V	Uma aplicação a cada 2 semanas totalizando 5 aplicações	1,2,4 e 8 semanas após a extração	Tomografia por emissão de micro-pósitrons	Desenvolvimento de lesões de Osteonecrose nos ratos submetidos ao Z.A
Silveira Soares 2018	Ratos/Osso alveolar	Z.A 0.6 mg/kg I.P	5 doses a cada 28 dias	150 dias	Histológica Microtomografia computadorizada	A sobre-supressão da remodelação óssea induzida pela medicação pode induzir a corticalização óssea e afetar seriamente a vascularização, desempenhando um papel fundamental no reparo ósseo mandibular e no desenvolvimento da osteonecrose

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2: Estudos que utilizaram o vidro bioativo como substituto ósseo

Autor/ Ano	Modelo Experimental/ Região do Defeito	Tamanho do Defeito: Crítico ou não Crítico	Tempo de Eutanásia	Uso ou não de Membrana	Análise Realizada	Conclusão
ZAZGYVA, A.M et al., 2015	Fêmur de Coelho	4,0 mm	5 semanas	Não	Histológica	Início precoce de um processo de reparo ósseo
CAMARGO A.F.F., et al 2015	Fêmur de Coelho	1,0 cm	2 semanas	Não	Histomorfométrica	O vidro bioativo, quando utilizado para preencher defeitos cavitários em coelhos, apresenta superioridade no número de osteoblastos e inferioridade no número de osteócitos quando comparado ao autoenxerto.
GUNN, J. M. et al., 2013	Fêmur de Rato	4,5 mm	3,6,12 e 24 semanas	Não	Histomorfométrica	O vidro S53P4 pode ser considerado um melhor preenchimento ósseo do que carbonato de cálcio derivado de corais
TOLLI H. et al., 2010	Diáfise (Fêmur)	8,0 mm e colocação de um implante	8 e 10 semanas	Não	Radiográfica Tomográfica Testes mecânicos	Os grânulos de biovidro parecem ter bom desempenho como um transportador de extrato de proteína óssea
TUUSA S.M.R et al., 2007	Osso Frontal de Coelho	5,0 mm	3,6 e 8 semanas	Não	Histomorfométrica	A nova formação óssea foi ocasionalmente vista como pequenas manchas em contato próximo com a superfície do polímero e o grânulo do BAG
Helena Yli-Urpo. et al., 2005	Cães Beagles	Restauração Classe III	1,3 e 6 semanas	-	Microscopia Elettronica de Varredura	CIV modificados com resina contendo BAG são materiais restauradores promissores para uso clínico, tendo um aumento na mineralização dentinária
AHO A.J. et al., 2004	Tíbia de Coelho	10 mm	4 e 8 semanas	Não	Histomorfométrica Radiológica	Substituto ósseo que pode ser usado na reconstrução de grandes defeitos
SALAKO N. et al., 2003	Rato	Pulpotomia do Primeiro Molar	2 e 4 semanas	-	Histológica	Induziu uma resposta anti-inflamatória em 2 semanas com a resolução da inflamação em 4 semanas
Narhi T.O et al., 2003	Tíbia de Coelho	4,0 mm de Diâmetro 6,0 Profundidade	8 e 16 semanas	Não	Histomorfométrica	Grânulos de vidro só podem conduzir o crescimento ósseo de forma eficiente, desde que um contato direto entre o vidro e o osso possa ser alcançado. A biocompatibilidade do composto deve ser aprimorada melhorando o contato dos grânulos de vidro com o osso circundante, criando estruturas porosas interconectadas dentro do composto ou acelerando a taxa de degradação da matriz do copolímero
PELTOLA M.J. et al., 2001	Coelho	Preenchimento de Seio Frontal e Defeito Calvária	1,3,6 e 12 meses pós operatório	Não	Histomorfométrica Microscopia Elettronica de Varredura Raio-X	Ambos os materiais bioativos estudados foram bem tolerados em seios frontais e em defeitos ósseos calvários
LINDFORS N.C. et al., 2000	Coelho	Coluna Vertebral	4 e 12 semanas	Não	Histomorfométrica	O vidro bioativo serve como um estímulo osteogênico para a formação óssea e o osso crescerá a partir das vértebras entre os grânulos, resultando em ligação de vidro e osso
EKHOLM et al., 2005	Fêmur de Rato	10 x 2,3mm	2, 4, 6, 12 e 52 semanas	Não	Histomorfométrica Histológica Radiográfica	O revestimento de celulose com apatita não acelerou o processo de ossificação. De fato, as propriedades de promoção do crescimento ósseo da celulose foram reduzidas
AHO, TIRRI, et al., 2004	Côndilo medial do fêmur distal de coelho	6 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade	4,8 e 23 semanas	Não	Microscopia eletrônica de varredura	Mostrou satisfazer várias das propriedades necessárias para um osso injetável ideal, sendo bioativo e biocompatível, osteocondutor, dúctil e convenientemente injetáveis com curto tempo de endurecimento

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 3: Estudos que avaliaram o reparo ósseo com a terapia laser

Autor (Ano)	Modelo Experimental	Local do defeito	Características do LASER	Método de aplicação do LASER	Períodos Avaliados	Análise	Conclusão
3arushka (1995)	Rato	Tíbia	Laser He-Lc 632 nm, 6,0 mW e 1,9 mm de diâmetro do feixe	5 e 6 dias pós operatório uma vez ao dia por 2 minutos	9, 10, 11, 12 e 15 dias	Histológica e Histomorfométrica	O Laser favoreceu o reparo de fraturas ou defeitos agudos nos ossos
Ninomiya (2007)	Rato	Fêmur	Q-switched Nd:YAG laser (comprimento de onda de 1064 nm)	10 minutos, 2 vezes ao dia	1,3,5 3 7 dias após o procedimento	Histológica e Histomorfométrica	Aumento do volume ósseo, espessura trabecular, taxa de aposição mineral, índices de densidade mineral óssea.
Kazancioglu (2013)	Rato	Calvaria	Laser de diodo 808 nm, 0,1 W	120 segundos por dia, 3 dias por semana, durante 2 semanas	1 mês	Histológica e Histomorfométrica	Aumentou a formação óssea comparado ao grupo controle
Weber (2017)	Rato	Extração dos Molares Esquerdos	Laser de diodo arsenieto (AlGaAs)	Durante o intraoperatório e a cada 24 h por 15 dias	14 dias	Clínica, Histológica e Histomorfométrica	Influência positiva no processo de reparo ósseo e dos tecidos moles
Yildirimturk (2017)	Rato	Tíbia	Laser de diodo arsenieto (AlGaAs) 820nm	3 vezes por semana, durante 4 semanas	4 semanas	Histológica	Efeitos benéficos na cicatrização de defeitos ósseos em condições diabéticas
De Oliveira (2017)	Rato	Calvária	Laser de diodo arsenieto (AlGaAs) 780nm	Imediatamente após a cirurgia e em intervalos de 48 e 96 horas	21 e 30 dias	Radiográfica, Histológica, Imunohistoquímica e Imunofluorescência	Favoreceu o reparo ósseo
Pinheiro (2017)	Rato	Tíbia	Laser de diodo arsenieto (AlGaAs) 780nm	Intervalos de 48 horas durante 2 semanas	15 e 30 dias	Espectroscopia	Melhorou o reparo de defeitos ósseos enxertados com o biomaterial aumentando a deposição de fosfato HA como marcado por estimadores bioquímicos.
Atasoy (2017)	Rato	Tibia	Laser de diodo arsenieto (AlGaAs) 940nm	Imediatamente após a sutura, 2,4,6,8,10 e 12 dias após	4 e 8 semanas	Histopatológica	Pode não acelerar o processo de reparo ósseo nas fases iniciais e tardias em comparação com o grupo controle sem a aplicação do laser
Dereci (2016)	Rato	Calvária	Laser de diodo arsenieto (AlGaAs) 980nm	5 minutos imediatamente após a cirurgia e 6 dias após	21 dias	Histomorfométrica	Aumento significativamente da regeneração óssea em defeitos críticos quando comparado ao grupo controle
Bosco (2016)	Rato	Calvária	Laser de diodo arsenieto (AlGaAs) 660nm	8 pontos ao redor do defeito e um ponto central imediatamente a confecção do defeito	30 e 60 dias	Histológica e Histomorfométrica	Melhorou o reparo ósseo e acelerou a reabsorção das partículas do biomaterial
Morcira (2018)	Rato	Calvária	Laser de diodo arsenieto (AlGaAs) 780nm	4 pontos ao redor e uma no centro, apenas uma única vez	30 dias	Histomorfométrica	Não houve aumento na neoformação óssea quando associado ao osso autógeno ou vidro bioativo
Coskun (2018)	In vitro	Cultura de célula	Laser de diodo arsenieto (AlGaAs) 820nm	24-48 horas	24-48 horas	Teste XTT	Eficaz em promover a proliferação celular e encurtar o período de cicatrização de forma eficaz
Amaroli (2018)	In vitro	Cultura de célula	Laser de diodo 808nm	1 cm de distancia das células por 60 segundos a cada 24 horas	0, 5, 10 e 15 dias	Análise de Fluorescência e Espectrofotometria	Promoveu a diferenciação de células estromais da medula óssea em direção à osteogênese, aumentou a síntese de TGFβ e facilitou a diferenciação de osteoblastos

Fonte: Elaborado pela autora.

6 CONCLUSÃO

O uso do vidro bioativo S53P4 e laser influenciou positivamente o processo de reparo ósseo em ratas submetidas à terapia com ácido zoledrônico.

REFERÊNCIAS

1. Borromeo GL, Tsao CE, Darby IB, Ebeling PR. A review of the clinical implications of bisphosphonates in dentistry. **Australian Dental Association**. 2011; 56: 2-9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21332734>
2. Cheng A, Daly CG, Logan RM, Stein B, Goss AN. Alveolar bone and the bisphosphonates. **Australian Dental Journal** 2009;54(Suppl 1):S51–61. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19737268>
3. Yamashita J, Koi K, Yang DY, McCauley LK. Effect of Zoledronate on Oral Wound Healing in Rats. **Clin Cancer Res** 2010; 17(6); 1405–14. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21149614>
4. Palacio EP, Muller SS, Sardenberg T, Mizobuchi RR, Galbiatti JA, Durigan Jr. A, et al. Detecting Early Biomechanical Effects of Zoledronic Acid on Femurs of Osteoporotic Female Rats. **Journal of Osteoporosis**. 2012; Epub 2012 Dec 4. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jos/2012/162806/>
5. Garcia VG, Conceição JM, Fernandes LA, Almeida JM, Nagata MJH, Alvaro Francisco Bosco AF, Theodoro LH. 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; 28:407–14. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/173460/2-s2.0-84986592853.pdf;jsessionid=07533674375389A79C01447B39702986?sequence=1>

6. Jakse N, Payer M, Tangl S, Berghold A, Kirmeier R, Lorenzoni M. Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation. An experimental study on sheep. **Clin Oral Implants Res.** 2007;18(4):517-24. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17451409>

7. Wynn R. Bisphosphonates, hypercalcemia of malignancy, and osteonecrosis of the jaw. **Gen Dent** 2005; 53:392. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16366043>

8. Nascimento SB, Cardoso CA, Ribeiro TP, Almeida JD, Albertini R, Munin E, Arissawa EA. Effect of low level laser therapy and calcitonin on bone repair in castrated rats: a densitometric study. **Photomed Laser Surg.** 2010;28(1):45-9. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/pho.2008.2396>

9. Hokugo A, Christensen R, Chung EM, Sung EC, Felsenfeld AL, Sayre JW, et al. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. **J. Bone Miner. Res.** 2010;25:1337–1349. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20200938>

10. Yaman F, Agaçayak S, Atilgan S, Benliday E, Ucan MC, Erol B, Kaya B, Gunay A, Guven S: Effects of Systemic Zoledronic Acid Administration on Osseointegration of Hydroxyapatite-Coated and Resorbable Blast Material Surface Implants in Rabbit Models. **International Journal Oral and Maxillofacial Implants** 2012;27:1443–1447. Disponível em:

<https://pdfs.semanticscholar.org/6c7f/6bcba163165631f07ff007ce85b3a1d13f09.pdf>

11. Okamoto Y, Hirota M, Monden Y, Murata S, Koyama C, Mitsudo K, Iwai T, Ishikawa Y, Tohnai I: High-dose zoledronic acid narrows the periodontal space in rats. **International Journal Oral and Maxillofacial Surgery**.2013; 42: 627–631. Disponível em: <https://scite.ai/reports/10.1016/j.ijom.2012.11.011>
12. Yilmaz, D., Dogan, N., Ozkan, A., Sencimen, M., Eren, B., Mutlu, I., 2014. Effect of platelet rich fibrin and beta tricalcium phosphate on bone healing. A histological study in pigs. **Acta Cirurgica Bras**. 29 (1), 59–65. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24474179>
13. Dohan, D.M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S.L., Dohan, A.J., Mouhyi, J., et al, 2006. Platelet-rich fibrin (PRF): a second- generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 101, 37–44. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504849>
14. Dohan Ehrenfest, D.M., Rasmusson, L., Albrektsson, T., 2009. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte-and plateletrich fibrin (L-PRF). **Trends Biotechnol.** 27, 158–167. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19187989>
15. Zhang, Y., Tangl, S., Huber, C.D., Lin, Y., Qiu, L., Rausch-Fan, X., 2012. Effects of Choukroun’s platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: a histological and histomorphometric study. *J.*

Craniomaxillofac. Surg. 40, 321–328. Disponível em

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21664828>

16. Marx, R.E., 2001. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant Dent.** 10, 225–228. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11813662>

17. Lee, W.J., Kim, S.G., Kim, J.Y., Lee, Y.C., Choi, J.Y., Dragos, R., Rotaru, H., 2012. Restoration of a peri-implant defect by platelet-rich fibrin. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** 113, 459–463. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22676926>

18. Zimmermann, R., Jakubietz, R., Jakubietz, M., Strasser, E., Schlegel, A., Wilfang, J., et al, 2001. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application.

Transfusion 41, 1217–1224. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606819>

19. KWON, Y.D.; OHE, J.Y.; KIM, D.Y.; CHUNG, D.J.; PARK, Y.D. Retrospective study of two biochemical markers for the risk assessment of oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: can they be utilized as risk markers? **Clin Oral Implants Res**, v.22, n.1, p.100-105, Jan, 2011. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0501.2010.01965.x>. Acesso em: 10 de setembro de 2019.

20. PONTORIERO, R. et al. Guided tissue regeneration in degree II furcation-involved mandibular molars. A clinical study. **J Clin Periodontol**, v. 15, n. 4, p. 247-54, Apr 1988. ISSN 0303-6979.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3164333> >.

21. QI, W. X. et al. Risk of osteonecrosis of the jaw in cancer patients receiving denosumab: a meta-analysis of seven randomized controlled trials. **Int J Clin Oncol**, v. 19, n. 2, p. 403-10, Apr 2014. ISSN 1437-7772. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23605142> >.
22. RAHAMAN, M. N. et al. Bioactive glass in tissue engineering. **Acta Biomater**, v. 7, n. 6, p. 2355-73, Jun 2011. ISSN 1878-7568. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21421084> >.
23. ROLLASON, V. et al. Interventions for treating bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). **Cochrane Database Syst Rev**, v. 2, p. CD008455, Feb 2016. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26919630> >.
24. ROMANÒ, C. L. et al. A comparative study of the use of bioactive glass S53P4 and antibiotic-loaded calcium-based bone substitutes in the treatment of chronic osteomyelitis: a retrospective comparative study. **Bone Joint J**, v. 96-B, n. 6, p. 845-50, Jun 2014. ISSN 2049-4408. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24891588> >.
25. RUGGIERO, S. L. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 72, n. 10, p. 1938-56, Oct 2014. ISSN 1531-5053. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25234529> >.
26. SAAD, F. et al. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. **Ann Oncol**, v. 23, n. 5, p. 1341-7, May 2012. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21986094> >.
27. SALAKO, N. et al. Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfate, and formocresol as pulpotomy agents in rat molar. **Dent Traumatol**, v. 19, n. 6, p. 314-20, Dec 2003. ISSN 1600-4469. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15022999> >.
28. SALAMANCA, E. et al. In Vitro and In Vivo Study of a Novel Porcine Collagen Membrane for Guided Bone Regeneration. **Materials (Basel)**, v. 9, n. 11, Nov 2016. ISSN 1996-1944. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28774071> >.
29. SANZ-SÁNCHEZ, I. et al. Effectiveness of Lateral Bone Augmentation on the Alveolar Crest Dimension: A Systematic Review and Meta-analysis. **J Dent Res**, v. 94, n. 9 Suppl, p. 128S-42S, Sep 2015. ISSN

- 1544-0591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26215467> >.
30. SCHEMITSCH, E. H. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! **J Orthop Trauma**, v. 31 Suppl 5, p. S20-S22, Oct 2017. ISSN 1531-2291. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28938386> >.
31. SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop Relat Res**, n. 205, p. 299-308, Apr 1986. ISSN 0009-921X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3084153> >.
32. SILVEIRA SOARES, M. Q. et al. Zoledronic Acid Induces Site-Specific Structural Changes and Decreases Vascular Area in the Alveolar Bone. **J Oral Maxillofac Surg**, Mar 2018. ISSN 1531-5053. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29626448> >.
33. STATKIEVICZ, C. et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. **J Photochem Photobiol B**, v. 184, p. 7-17, May 2018. ISSN 1873-2682. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29777942> >.
34. STOOR, P.; APAJALAHTI, S.; KONTIO, R. Regeneration of Cystic Bone Cavities and Bone Defects With Bioactive Glass S53P4 in the Upper and Lower Jaws. **J Craniofac Surg**, v. 28, n. 5, p. 1197-1205, Jul 2017. ISSN 1536-3732. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28538076> >.
35. TANG, X. et al. Bisphosphonates suppress insulin-like growth factor 1-induced angiogenesis via the HIF-1alpha/VEGF signaling pathways in human breast cancer cells. **Int J Cancer**, v. 126, n. 1, p. 90-103, Jan 2010. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19569175> >.
36. TURUNEN, T. et al. Bioactive glass granules as a bone adjunctive material in maxillary sinus floor augmentation. **Clin Oral Implants Res**, v. 15, n. 2, p. 135-41, Apr 2004. ISSN 0905-7161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15008925> >.
- 37.
38. TUUSA, S. M. et al. Frontal bone defect repair with experimental glass-fiber-reinforced composite with bioactive glass granule coating. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 82, n. 1, p. 149-55, Jul 2007. ISSN 1552-4973. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17106892> >.
39. TÖLLI, H. et al. Bioglass as a carrier for reindeer bone protein extract in the healing of rat femur defect. **J Mater Sci Mater Med**, v. 21, n. 5, p.

- 1677-84, May 2010. ISSN 1573-4838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20162331> >.
40. VAJGEL, A. et al. A systematic review on the critical size defect model. **Clin Oral Implants Res**, v. 25, n. 8, p. 879-93, Aug 2014. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23742162> >.
41. VAN GESTEL, N. A. et al. Clinical Applications of S53P4 Bioactive Glass in Bone Healing and Osteomyelitic Treatment: A Literature Review. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 684826, 2015. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26504821> >.
42. VERMEER, J. et al. Bone-site-specific responses to zoledronic acid. **Oral Dis**, v. 23, n. 1, p. 126-133, Jan 2017. ISSN 1601-0825. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27706930> >.
43. VERMEER, J. A. et al. Jaw bone marrow-derived osteoclast precursors internalize more bisphosphonate than long-bone marrow precursors. **Bone**, v. 57, n. 1, p. 242-51, Nov 2013. ISSN 1873-2763. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23962725> >.
44. VÄLIMÄKI, V. V.; ARO, H. T. Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute. **Scand J Surg**, v. 95, n. 2, p. 95-102, 2006. ISSN 1457-4969. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16821652> >.
45. WEBER, J. B.; CAMILOTTI, R. S.; PONTE, M. E. Efficacy of laser therapy in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): a systematic review. **Lasers Med Sci**, v. 31, n. 6, p. 1261-72, Aug 2016. ISSN 1435-604X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27025860> >.
46. WEBER, J. B. B. et al. Effect of low-level laser therapy on tissue repair after dental extraction in rats administered zoledronic acid and dexamethasone. **J Biomed Opt**, v. 22, n. 5, p. 58001, 05 2017. ISSN 1560-2281. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28500856> >.
47. WILSON, T. et al. Intact surface of bioactive glass S53P4 is resistant to osteoclastic activity. **J Biomed Mater Res A**, v. 77, n. 1, p. 67-74, Apr 2006. ISSN 1549-3296. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16355410> >.
48. YAO, L. et al. Efficacy and safety of bisphosphonates in management of low bone density in inflammatory bowel disease: A meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**, v. 96, n. 3, p. e5861, Jan 2017. ISSN 1536-5964. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28099343> >.

49. YILDIRIMTURK, S. et al. The effects of low-level laser therapy on the healing of bone defects in streptozotocin-induced diabetic rats: A histological and morphometric evaluation. **J Cosmet Laser Ther**, p. 1-7, Jun 2017. ISSN 1476-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28622041> >.
50. YLI-URPO, H.; NÄRHI, M.; NÄRHI, T. Compound changes and tooth mineralization effects of glass ionomer cements containing bioactive glass (S53P4), an in vivo study. **Biomaterials**, v. 26, n. 30, p. 5934-41, Oct 2005. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15958240> >.
51. YOSHIOKA, Y. et al. Molecular alterations of newly formed mandibular bone caused by zoledronate. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Mar 2018. ISSN 1399-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29550280> >.
52. ZAZGYVA, A. M. et al. S53P4 bioactive glass and fibrin glue for the treatment of osteochondral lesions of the knee - a preliminary in vivo study in rabbits. **Rom J Morphol Embryol**, v. 56, n. 3, p. 1085-90, 2015. ISSN 1220-0522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26662143> >.
53. ZEHNDER, M. et al. Preliminary evaluation of bioactive glass S53P4 as an endodontic medication in vitro. **J Endod**, v. 30, n. 4, p. 220-4, Apr 2004. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15085050> >.
54. ZENG, D. et al. Fabrication of large-pore mesoporous Ca-Si-based bioceramics for bone regeneration. **Int J Nanomedicine**, v. 12, p. 8277-8287, 2017. ISSN 1178-2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29180865> >.
55. ZHOU, D. et al. Comparative study of porous hydroxyapatite/chitosan and whitlockite/chitosan scaffolds for bone regeneration in calvarial defects. **Int J Nanomedicine**, v. 12, p. 2673-2687, 2017. ISSN 1178-2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28435251> >.
56. LAZAROVICI, T.S. et al. Serologic bone markers for predicting development of osteonecrosis of the jaw in patients receiving bisphosphonates. **J Oral Maxillofac Surg**, v.68, n.9, p.2241-2247, Sep, 2010. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278-2391\(10\)00587-2](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278-2391(10)00587-2). Acesso em: 10 de setembro de 2019.

ANEXO A



PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DO LASER, PRP E ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO EM RATAS OVARECTOMIZADAS", protocolada sob o CEUA nº 4974081216, sob a responsabilidade de **Jéssica Lemos Guinelli e equipe; Marcus Vinicius Satoru Kasaya** - 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 do Sagrado Coração (CEUA/USC) na reunião de 01/02/2017.

We certify that the proposal "Effect of laser, PRP and zoledronic acid on the bone repair process of ovariectomized rats", utilizing 192 Heterogenic rats (192 females), protocol number CEUA 4974081216, under the responsibility of **Jéssica Lemos Guinelli and team; Marcus Vinicius Satoru Kasaya** - 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 Sagrado Coração University (CEUA/USC) in the meeting of 02/01/2017.

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

Vigência da Proposta: de **04/2017** a **08/2017**

Área: **Cirurgia E Traumatologia Bucamaxilofacial**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **20 a 30 dias**

N: **192**

Linhagem: **Rattus norvegicus albinus/Wistar**

Peso: **250 a 300 g**

Resumo: O objetivo deste estudo é avaliar o processo de reparo em defeitos ósseos criados cirurgicamente na calvária de ratas ovariectomizadas, tratadas com ácido zoledrônico associado a LASER (terapia de baixa potência) e Plasma Rico em Fibrina, por meio da análise histológica, histométrica, imunohistoquímica e microtomográfica. Cento e vinte e oito ratas fêmeas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com aproximadamente 300 gramas, serão incluídas na pesquisa experimental. Os animais serão distribuídos em 2 grupos: Metade dos animais (64 ratas) serão submetidos à ovariectomia bilateral (grupo OVX) e o restante (64 ratas) sham ou falsa ovariectomia, para simulação do estresse cirúrgico (grupo SHAM). Após o procedimento cirúrgico de ovariectomia e sham, os animais serão alocados em 8 sub-grupos (8 animais/grupo) dentro de cada grupo (OVX e SHAM), e submetidos a terapia com soro fisiológico, ácido zoledrônico, plasma rico em fibrina e LASER durante 30 dias. Após 56 dias do início da administração do bisfosfonato será realizado o procedimento cirúrgico para a criação dos defeitos ósseos nas calvárias dos animais com auxílio de trefina de 5mm. A eutanásia dos animais será realizada após 14 e 28 dias da cirurgia da confecção dos defeitos ósseos. As amostras das calvárias contendo a região do defeito ósseo serão removidas e submetidas ao processamento laboratorial para obtenção de lâminas com cortes longitudinais de 5 mm para as análises histológicas e imunohistoquímicas. Para a avaliação histológica serão considerados o padrão do infiltrado inflamatório, neoformação, maturação, remodelação e viabilidade óssea. Os cortes histológicos também serão submetidos ao processamento imunohistoquímico para a expressão das proteínas RANK-L, osteoprotegerina (OPG), RUNX 2, osteocalcina (OC) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) no pós-operatório de 14 e 28 dias. As marcações imunohistoquímicas serão analisadas qualitativamente e quantitativamente no tecido ósseo neoformado. Na análise da microtomografia, os espécimes obtidos serão submetidos à tomografia para posterior mensurações tridimensionais da neoformação óssea no interior dos defeitos parietais. Para a análise histométrica será realizada a individualização e delimitação da área do defeito correspondente à região da cortical das calvárias, esta área será denominada Área Total (AT). Dentro da Área Total (AT), será realizada a delimitação das áreas correspondentes ao osso neoformado para obtenção da área de osso neoformado (AON). A comparação intragrupos nos diferentes períodos, será realizada por meio do t-test ($p = 5\%$). Já para comparação intergrupos, será realizado o teste ONE WAY ANOVA ($p = 5\%$), em seguida, para os grupos nos quais hajam diferença estatisticamente significativa, será utilizado o teste de Student-Newman-Keuls ($p = 5\%$).

Local do experimento: Biotério da USC

Bauru, 06 de fevereiro de 2017



UNIVERSIDADE DO
**SAGRADO
CORAÇÃO**
A Universidade da sua vida

PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

Profa. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dra. Andréia Silva
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Sagrado Coração