

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

MATHEUS AMBROSIO F. M. DOS SANTOS

**EFEITO DA TERAPIA A LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO REPARO
DE DEFEITOS ÓSSEOS PREENCHIDOS COM OSSO BOVINO
INORGÂNICO: ESTUDO EM CALVÁRIA DE RATOS**

VITÓRIA/ES

2019

MATHEUS AMBROSIO F. M. DOS SANTOS

**EFEITO DA TERAPIA A LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO REPARO
DE DEFEITOS ÓSSEOS PREENCHIDOS COM OSSO BOVINO
INORGÂNICO: ESTUDO EM CALVÁRIA DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof. Dra. Rossiene Motta Bertollo
Coorientadora: Prof. Dra. Daniela Nascimento Silva

VITÓRIA/ES

2019

MATHEUS AMBROSIO F. M. DOS SANTOS

**EFEITO DA TERAPIA A LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO REPARO
DE DEFEITOS ÓSSEOS PREENCHIDOS COM OSSO BOVINO
INORGÂNICO: ESTUDO EM CALVÁRIA DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Clínica Odontológica do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos requeridos exigidos para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Aprovada em _____ de _____ de
20____.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dra. Rossiene Motta Bertollo
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dra. Daniela Nascimento Silva
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientadora

Prof. Dra. Silvana dos Santos Meyrelles
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Sérgio Lins de Azevedo Vaz
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que em sua infinita bondade me concedeu a alegria de alcançar mais um objetivo em minha carreira acadêmica.

Aos meus queridos pais, que com a força do exemplo de suas vidas me forjaram no caminho da honestidade, dedicação e perseverança sem os quais jamais seria possível concluir mais esta etapa.

Aos meus irmãos pela presença marcante que tem em toda a minha vida e que mesmo indiretamente são fonte de inspiração para as minhas conquistas.

Agradeço de forma especial a minha amada esposa pela parceria e apoio incondicional indispensável para superar os desafios ao longo deste tempo.

A minha orientadora professora Dra. Rossiene Motta Bertollo pelo convívio gentil ao longo destes anos na Pós-Graduação. Você foi um exemplo de capacidade e dedicação. Tenho convicção que este projeto apenas foi possível graças aos seus esforços em reunir os meios necessários para a execução de toda a etapa experimental. Nossas reuniões sempre produziram resultados fantásticos que engrandeceram este trabalho. Pude aprender muito e agradeço a oportunidade e confiança depositada.

A professora Dra. Daniela Nascimento Silva quem me direcionou ao departamento de cirurgia.

Ao Dr. Rodolpho José da Silva Barros, médico veterinário responsável pelo Biotério da UFES, pelo esforço intenso durante o treinamento na manipulação dos animais e no estudo piloto. Muito obrigado pela sua dedicação.

A todos do laboratório de Fisiologia Translacional especialmente os professores Dra. Silvana dos Santos Meyrelles e Dr. Elisardo Corral Vazques, por abrir as portas do laboratório e possibilitar a realização de toda a fase experimental. Obrigado pelo convívio amigável e suporte que me deram.

Ao professor professor Dr. Marcos da Silva Pacheco por me aceitar como estagiário na disciplina de histologia e pela orientação no planejamento e execução das análises histológicas.

Agradeço as servidoras do Laboratório de Histologia, Luciene Bessoni, Viviane Coutinho Meneguzzi e Rafaela Araújo Fernandes, sem as quais não seria possível a confecção e fotografias das lâminas histológicas.

A Dra. Karla Rovaris pela aquisição e análise das imagens microtomográfica.

Ao Professor Dr. Francisco Cândido Barreto Cardoso Barreto pela análise estatística dos dados.

Aos amigos que fiz no programa de Mestrado em Clínica Odontológica, meus colegas das turmas que pude participar e que fizeram parte desta caminhada, vocês foram muito importantes e sempre serão lembrados com grande carinho.

A todas as pessoas que de algum modo contribuíram para a conclusão deste curso de Mestrado. Muito obrigado!

Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo por esta formação educacional.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito da Terapia a Laser de Baixa Potência (TLBP) na quantidade de tecido ósseo neoformado em defeito ósseo crítico (DOC) preenchido com coágulo ou osso bovino inorgânico (OBI), em diferente número de sessões.

Metodologia: um total de 42 ratos machos foi distribuído em quatro grupos de acordo com o número de sessões de TLBP: C (controle - não irradiado), L4 (quatro sessões), L7 (sete sessões), L11 (onze sessões). Em cada calvária foram produzidos dois DOC preenchidos com OBI ou coágulo sanguíneo que foram irradiados com os mesmos parâmetros dosimétricos. As sessões foram iniciadas imediatamente após a cirurgia e mantidas em intervalos de 48 h. Os animais foram eutanasiados em 15 ou 30 dias após a cirurgia. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Tukey.

Resultados: Nas cavidades preenchidas com coágulo, observado o período de 15 dias, apenas o grupo L7, mostrou maior neoformação óssea (49,74%), com diferença estatística significativa ($p < 0,05$), em comparação ao grupo C (26,96%); no período de 30 dias, independentemente do tratamento, não houve diferenças estatísticas significantes na quantidade de tecido formado entre os grupos ($p > 0,05$). Nas cavidades preenchidas com OBI, observado o período de 15 dias, houve resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$), com maior formação de tecido ósseo nos grupos L4 (30,55%) e L7(35,12%) quando comparados ao grupo C (22,3%), mas sem diferença estatística entre ambos ($p > 0,05$); após o período de 30 dias, a percentagem de osso neoformado foi maior nos grupos L7 (51,94%) e L11 (52,19%), comparados ao C (37,38%), evidenciando diferença estatística ($p < 0,05$).

Conclusão: O número de sessões de TLBP é um fator importante a ser considerado pois influencia significativamente na quantidade de osso formado a partir do coágulo ou OBI.

Palavras-chave: Regeneração óssea, Terapia a Laser de Baixa Potência, Defeitos ósseos críticos, Enxerto ósseo, Biomateriais.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of the number of sessions of Low Level Laser Therapy (LLLT) in the amount of formed bone in critical size defects (CSD) filled with inorganic bovine bone (IBB) or blood clot. *Methodology:* Forty two male rats were divided into four groups according to the number of sessions: control (no irradiated), L4 (four sessions), L7 (seven sessions), L11 (eleven sessions). Two CSD defects were produced in each calvaria and filled with blood clot or IBB. The two cavities were irradiated with the same dosimetric parameters. The sessions started immediately after surgery and were maintained at 48 h intervals. The animals were euthanized 15 to 30 days after surgery. Data were analyzed by the one-way ANOVA with post hoc Tukey test. *Results:* After 15 days in the defects with blood clot, only the L7 group showed significantly higher bone formation (49.74%) compared to the control group (26.96%), ($P < 0,05$). In the 30-day period, regardless of treatment there were no statistically significant differences in the amount of tissue formed between the groups ($P > 0.05$). In the cavities filled with IBB, after 15 days there was significantly higher bone formation in L4 (30.55%) and L7 (35.12%) compared to the control group (22.3%) ($P < 0,05$), but there was no difference between both ($P > 0.05$). After 30 days the percentage of neoformed bone was statistically higher only in the L7 (51.94%) and L11 (52.19%) groups, compared to the control group (37.38%), ($P < 0.05$). *Conclusion:* The number of LLLT sessions is an important factor to consider because it significantly influences the amount of bone formed from the clot or IBB.

Keywords: Bone regeneration, Low-level laser therapy, Critical bone defects, Bone grafting, Biomaterials.

LISTA DE FIGURAS

<p>Figura 1: (A) Craniotomia para a realização do defeito ósseo crítico; (B) Imagem da dura-máter íntegra; (C) osso bovino inorgânico preenchendo a cavidade esquerda; (D) Demarcação da área sobre a cavidade e fotobiomodulação após a sutura.</p>	<p>..... 40</p>
<p>Figura 2: F(A) Dispositivo plástico e broca trefina; (B) Dispositivo acoplado à broca possibilitando limitar a profundidade de corte da ponta ativa.</p>	<p>..... 41</p>
<p>Figura 3: Seleção da área total do defeito ósseo preenchido com osso bovino inorgânico para mensuração dos parâmetros avaliados pelo software CTAn.</p>	<p>..... 42</p>
<p>Figura 4: (A) Visão panorâmica da região de maior diâmetro (5 mm) do defeito ósseo crítico preenchido por coágulo (Grupo L7 / 15 dias) e aspectos histológicos: deposição e mineralização de matriz óssea tanto nas margens quanto na região mais central dos defeitos cirúrgicos, com presença de áreas mineralizadas formando pontes de tecido ósseo em direção à região central com maior tendência ao fechamento completo da lesão; (B, C) Atividade osteoblástica e fibroblástica intensa na borda da lesão com deposição de matriz óssea e fibras colágenas. Lâminas coradas por HE, magnificação de 10X (A, B) e 40X (C).</p>	<p>..... 43</p>
<p>Figura 5: (A) Visão panorâmica da região de maior diâmetro (5 mm) do DOC preenchido com OBI (Grupo L7 / 30 dias) e aspectos histológicos: presença das partículas do biomaterial e formação de tecido osteóide por toda a área com espessura semelhante ao osso circundante; (B, C) Partícula de osso bovino inorgânico envolta por osteoblastos com produção e mineralização de matriz óssea. Lâminas coradas por HE, magnificação de 10X (A, B) e 40X (C).</p>	<p>..... 44</p>
<p>Figura 6: Gráfico de dispersão da percentagem da área mineralizada nas cavidades preenchidas por coágulo sanguíneo, nos grupos controle e submetidos à laserterapia no pós-cirúrgico de 15 dias (A) e 30 dias (C) e das cavidades preenchidas com osso bovino inorgânico com pós-cirúrgico de 15 dias (B) e 30 dias (D). (*$p < 0,05$ vs. controle).</p>	<p>..... 45</p>
<p>Figura 7: (A, B, C) Fotomicrografias das lâminas em HE com aumento de 10X e visão panorâmica da região de maior diâmetro (5 mm) das cavidades ósseas preenchidas por coágulo e acompanhamento de 15 dias nos grupos: Controle (A), L4 (B) e L7 (C). (D, E, F) Imagens delimitadas no <i>software Image J</i></p>	<p>..... 46</p>

representando comparativamente em vermelho as áreas de tecido ósseo mineralizado formado nos grupos Controle (D), L4 (E) e L7 (F).

Figura 8: (A, B, C) Fotomicrografias das lâminas em HE com aumento de 10X e visão panorâmica da região de maior diâmetro (5 mm) das cavidades ósseas preenchidas com osso bovino inorgânico e acompanhamento de 30 dias nos grupos: Controle (A), L4 (B), L7 (C), L11 (D). (E, F, J, H) Imagens delimitadas no *software Image J* representando comparativamente em vermelho as áreas de tecido ósseo mineralizado formado nos grupos controle (E), L4 (F), L7 (G) e L11 (H).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
CTAn - *Computed Tomography Analyser*
DOC - Defeito Ósseo Crítico
HE - Hematoxilina e Eosina
OBI - Osso Bovino Inorgânico
TLBP - Terapia a Laser de Baixa Potência
UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	ARTIGO: EFEITO DA TERAPIA A LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS PREENCHIDOS COM OSSO BOVINO INORGÂNICO: ESTUDO EM CALVÁRIA DE RATOS	17
3.1	INTRODUÇÃO	19
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.2.1	Aspectos Éticos e Amostra	20
3.2.2	Delineamento do Estudo	21
3.2.3	Procedimento Cirúrgico	21
3.2.4	Laserterapia	23
3.2.5	Histologia e Análise Histomorfométrica	23
3.2.6	Análise Micro Tomográfica	24
3.2.7	Análises Estatísticas	24
3.3	RESULTADOS	25
3.3.1	Análise Qualitativa das Lâminas Histológicas	25
3.3.2	Histologia das Cavidades Preenchidas por Coágulo	25
3.3.2.1	Grupo Controle	25
3.3.2.2	Grupos Experimentais	26
3.3.3	Histologia das Cavidades Preenchidas por OBI	26
3.3.3.1	Grupo Controle	26
3.3.3.2	Grupos Experimentais	26
3.3.4	Análise Histomorfométrica	27
3.3.5	Análise Micro Tomográfica	27
3.4	DISCUSSÃO	28
3.5	CONCLUSÃO	33
3.6	REFERÊNCIAS	34
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
	REFERÊNCIAS GERAIS	49
	APÊNDICE A - Dados numéricos da análise histomorfométrica	53

ANEXO A - Aprovação na Comissão de Ética no uso de animais	54
ANEXO B - Normas da Revista “<i>Archives of Oral Biology</i>”	55

1. INTRODUÇÃO GERAL

Grandes defeitos ósseos tem um profundo e negativo impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes afetados (TARRIDE et al., 2016). Entre as diversas causas dessas lesões estão traumas, cirurgias, malformações congênitas e patologias (VAJGEL et al., 2014; BOSCO et al., 2016). Essas grandes perdas de tecido ósseo são representadas experimentalmente pelo defeito ósseo crítico (DOC) sendo o da calvária de rato um dos modelos experimentais mais utilizados para avaliação da reparação óssea. O termo DOC foi originalmente definido como o menor tamanho de uma ferida óssea em um determinado osso de uma espécie animal que não seja capaz de reparar espontaneamente durante toda a vida do animal. Há controvérsias na literatura contemporânea sobre qual a dimensão mais apropriada para que um defeito ósseo em calvária possa ser considerado como crítico. Além do tamanho do defeito, a localização dele na calvária deve ser considerada, especialmente em relação ao envolvimento ou não da sutura sagital, devido a sua possível influência no processo de cicatrização (VAJGEL et al., 2014).

Clinicamente a correção das deformidades ósseas apresenta-se como um desafio clínico terapêutico complexo (TARRIDE et al., 2016) uma vez que se intenta a restauração completa da estrutura e função tecidual (HANKENSON et al., 2015). Este processo de reparo envolve citocinas e fatores de crescimento diversos que induzem a migração e a diferenciação celular (ACAR et al., 2016; XU et al. 2016). A coagulação sanguínea, resultante da lesão tecidual, precede uma resposta inflamatória não infecciosa, seguida de uma fase fibrovascular com formação de vasos sanguíneos e a migração de células mesênquimais progenitoras, que se diferenciam em osteoblastos responsáveis por depositar e mineralizar a matriz óssea. Finalmente o osso neoformado é remodelado por um processo de migração de osteoclastos estabelecendo o osso maduro. Este estágio final pode ser demorado e se encerra com a regeneração óssea (HANKENSON et al., 2015). Apesar dessa marcante capacidade regenerativa do tecido ósseo, muitas vezes são necessárias intervenções cirúrgicas com utilização de enxertos ósseos ora autógenos ora com associação de biomateriais, objetivando a completa neoformação tecidual (DIEZ et al., 2014).

Diferentes biomateriais têm sido propostos com intuito de reduzir a morbidade associada à área doadora de enxertos autógenos. Nesse cenário, o osso bovino inorgânico (OBI) apresenta composição biológica e microestrutural semelhante ao osso humano (KASUYA et al., 2018), sendo também o substituto ósseo mais bem documentado na literatura com comprovada capacidade de integração ao tecido ósseo e propriedades osteocondutoras (WU et al., 2016), servindo de suporte para a deposição e mineralização da matriz óssea (TRAINI et al., 2008). As partículas desse biomaterial sofrem reabsorção lenta e, portanto, tendem a ser rodeadas por osso em vez de serem reabsorvidas e entram nos processos fisiológicos de remodelação óssea (PIATELLI et al., 1999). Esse comportamento ocorre conforme o processamento específico que esses materiais recebem durante a desproteinização em altas temperaturas e a esterilização, antes de estarem disponíveis para uso clínico. A remoção do componente orgânico é feita a partir do aquecimento do material a altas temperaturas por mais de 15 horas. Embora permita e assegure a remoção de todo o componente orgânico e possíveis antígenos, a fim de evitar reações imunológicas indesejadas, reações alérgicas e eventuais riscos de infecções cruzadas, este tratamento também modifica a estrutura mineral da hidroxiapatita óssea e o biomaterial resultante geralmente possui um potencial de reabsorção reduzido (ZIZZARI et al., 2016).

Paralelamente, o laser (um acrônimo de “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação”) vem sendo apresentado como uma nova possibilidade terapêutica com resultados promissores no campo da regeneração óssea. A aplicação de lasers tem sido considerada um avanço tecnológico, sendo utilizados como adjuvantes devido ao seu efeito terapêutico e para bioestimular tecidos. Lasers de baixa intensidade, com comprimento de onda no espectro vermelho ou próximo ao infravermelho, promovem efeitos de fotobiomodulação celular e respostas terapêuticas induzidas por fotoquímica, fotoelétrica e reações fotoenergéticas (ZEIN et al., 2017).

A terapia a laser de baixa potência (TLBP) tem sido usada por pesquisadores em vários campos de saúde para acelerar a cicatrização de feridas em tecidos duros e moles. Nas ciências médicas, esta e outras terapias foram aplicadas para o reparo pós-cirúrgico e para fraturas de punho e mão. Em odontologia, a terapia a laser tem

sido utilizada clinicamente e avaliada, dentre outras indicações, no pós-cirúrgico de extrações dentárias, expansão rápida da maxila, após enxerto de tecido conjuntivo, para o tratamento da osteonecrose e para defeitos periodontais (SANTINONI et al., 2017).

Evidências comprovam que a TLBP em áreas de lesões ósseas, eleva a atividade osteoblástica e angiogênica local, acelerando o reparo tecidual e aumentando a quantidade de tecido ósseo formado (OLIVEIRA et al., 2014; MARQUES et al., 2015; ACAR et al., 2016).

Estudos vêm demonstrando o efeito positivo da TLBP na cicatrização do tecido ósseo (BARBOSA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; MARQUES et al., 2015), porém poucos avaliaram os efeitos da associação TLBP com biomateriais (BOSCO et al., 2016; MOREIRA et al., 2018). A associação entre a TLBP e os substitutos ósseos bovinos tem mostrado efeitos positivos pela estimulação da cicatrização e da regeneração tecidual (SANTINONI et al., 2017). Parece claro que a TLBP eleva o potencial osteocondutor desses biomateriais pela presença de maior percentagem de tecido ósseo neoformado (DE OLIVEIRA et al., 2018).

Embora os mecanismos de ação do laser sobre o tecido ósseo em regeneração não sejam totalmente esclarecidos, alguns achados indicam que a absorção da luz por estruturas da membrana plasmática desencadeia uma sequência de reações bioquímicas que resultam em estimulação mitocondrial, síntese de ATP e transporte de cálcio do citoplasma, induzindo assim vias de sinalizações reguladas por espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e ciclo adenosina monofosfato. De modo geral os efeitos da TLBP resultam em ativação de fatores de transcrição que modulam a migração, mitose, cicatrização e regeneração tecidual (KUNIMATSU et al., 2018).

Os efeitos do laser nos tecidos expostos dependem de diversos fatores, entre eles o tipo de célula irradiada, o estado redox da célula, os parâmetros de irradiação comprimento de onda, densidade de potência, densidade de energia e o tempo de exposição (HUANG et al., 2009; OBEROI et al., 2014). Segundo a literatura, a densidade de energia é a grandeza física que avalia a possibilidade de estimulação,

inibição ou não manifestação dos efeitos terapêuticos. Entretanto, a dosimetria para a TLBP não se restringe à densidade de energia, pois se ela se mantém constante, com variação da densidade de potência e do tempo de exposição, os resultados podem ser diferentes (GARCEZ et al., 2012). Pesquisas indicam que, se considerarmos somente a energia, despreza-se o fato de que a energia tem dois componentes: a potência e o tempo, havendo relatos que evidenciam que o tempo de exposição pode ser um fator relevante para a obtenção de bons resultados (AZEVEDO et al., 2006).

Teoricamente existem parâmetros ótimos de irradiação e dose que podem variar de acordo com a patologia subjacente, o tipo de tecido superficial e fatores associados à saúde geral do paciente (HUANG et al., 2011). Assim, uma dosagem inferior ao valor ideal pode ter um efeito reduzido, enquanto doses superiores podem ter resultados terapêuticos negativos (CHUNG et al., 2012; HUANG et al., 2009). Há uma ampla variedade nos protocolos de aplicação e grande amplitude dos parâmetros utilizados (ZEIN et al., 2017). Não foram identificados estudos que avaliassem a influência do número de sessões de TLBP sobre a quantidade de tecido ósseo formado.

Portanto na associação positiva do laser para o reparo ósseo em áreas de defeito ósseo crítico (DOC) em calvária de ratos, pode-se constatar grande diversidade nos principais parâmetros e doses utilizados, sugerindo que a janela bioestimuladora nesta aplicação seja bastante ampla (BRASSOLATTI et al., 2018).

A partir desses pressupostos a proposta deste estudo é analisar o efeito da TLBP no reparo do tecido ósseo em DOC preenchido com enxerto ósseo bovino inorgânico ou não, em diferentes intervalos de tempo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da TLBP na quantidade de tecido ósseo neoformado em modelo experimental de DOC preenchido com coágulo ou OBI, em diferentes intervalos de tempo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Investigar a influência do número de sessões da TLBP sobre a quantidade de tecido ósseo neoformado;
- b. Avaliar qualitativamente, por meio de análise histológica, o tecido ósseo neoformado;
- c. Quantificar, por meio da análise histomorfométrica, a percentagem do tecido ósseo mineralizado neoformado;
- d. Analisar por meio dos parâmetros microtomográficos o volume de tecido ósseo neoformado, a espessura e número de trabéculas.

3. ARTIGO

EFEITO DA TERAPIA A LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS PREENCHIDOS COM OSSO BOVINO INORGÂNICO: ESTUDO EM CALVÁRIA DE RATOS

Matheus Ambrosio Freitas Martins dos Santos¹, Daniela Nascimento Silva³, Karla Rovaris da Silva², Rossiene Motta Bertollo³

¹Aluno de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, Brasil

²Professora do Departamento de Patologia e Clínica Odontológica, Universidade Federal do Piauí, Piauí, Brasil

³Professora do Departamento de Clínica Odontológica, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, Brasil

Autor de correspondência:

Professora Dra. Rossiene Motta Bertollo

Endereço: Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe, Vitória ES; Prédio do Instituto de Odontologia da UFES, CEP 29.040-090, Vitória - ES, Brasil

E-mail: rmbertollo@gmail.com

Telefone: 55 27 99904-8351

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito da Terapia a Laser de Baixa Potência (TLBP) na quantidade de tecido ósseo formado em defeitos ósseos preenchido com osso bovino inorgânico (OBI) ou coágulo, em diferentes intervalos de tempo. *Metodologia:* um total de 42 ratos machos foi dividido em quatro grupos de acordo com o número de sessões: C (controle - não irradiado), L4 (quatro sessões), L7 (sete sessões), L11 (onze sessões). Em cada calvária foram produzidas duas cavidades de 5 mm e preenchidas com OBI ou coágulo sanguíneo que foram irradiados com os mesmos parâmetros dosimétricos. As sessões foram iniciadas imediatamente após a cirurgia e mantidas em intervalos de 48 h. Os animais foram eutanasiados em 15 ou 30 dias após a cirurgia. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Tukey. *Resultados:* Nas cavidades preenchidas com coágulo, observado o período de 15 dias, apenas o grupo L7, mostrou maior formação óssea (49,74%), com diferença estatística significativa ($p < 0,05$), em comparação ao grupo C (26,96%); no período de 30 dias, independentemente do tratamento, não houve diferenças estatísticas significantes na quantidade de tecido formado entre os grupos ($p > 0,05$). Nas cavidades preenchidas com OBI, observado o período de 15 dias, houve resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$), com maior formação de tecido ósseo nos grupos L4 (30,55%) e L7(35,12%) quando comparados ao grupo C (22,3%) sem diferença estatística entre ambos ($p > 0,05$); após o período de 30 dias, a percentagem de osso neoformado foi maior nos grupos L7 (51,94%) e L11 (52,19%), comparados ao C (37,38%), evidenciando diferença estatística ($p < 0,05$). *Conclusão:* O número de sessões de TLBP é um fator importante a ser considerado pois influencia significativamente na quantidade de osso formado a partir do coágulo ou OBI.

Palavras-chave: Regeneração óssea, Terapia a Laser de Baixa Potência, Defeitos ósseos críticos, Enxerto ósseo, Biomateriais.

3.1 INTRODUÇÃO

Apesar da alta capacidade regenerativa do osso, muitas vezes a extensão da lesão pode limitar a completa reparação, impactando negativamente a qualidade de vida dos pacientes afetados (Tarride et al., 2016; Wijbenga et al., 2016). Grandes defeitos ósseos são causados por diversos fatores, entre eles traumas, cirurgias ósseas, malformações congênitas e diversas patologias, sendo um desafio terapêutico (Wang et al., 2018). Estas alterações são experimentalmente reproduzidas em animais utilizando o modelo de defeitos ósseos críticos (DOC), que são caracterizados como aqueles na qual a perda óssea intrínseca é tão extensa, que impossibilita a completa regeneração do tecido ósseo sem que intervenções externas sejam executadas (Schmitz et al., 1986).

O aperfeiçoamento da resposta tecidual no processo de reparo ósseo é um tema de estudo com relevância em diversas especialidades clínicas (Barbosa et al., 2013; Marques et al., 2015; Bosco et al., 2016; Acar et al., 2016; de Oliveira et al., 2018). Nesse sentido, diversas técnicas cirúrgicas, inovações biotecnológicas, biomateriais e outras terapias têm sido propostas para acelerar e melhorar a regeneração do tecido ósseo (Vajgel et al., 2014). O osso autógeno é considerado "padrão ouro" com propriedades osteoindutivas, osteocondutoras e osteoprogenitoras (Reininger et al., 2016), além de ser associado ao menor tempo de cicatrização quando comparado aos enxertos com biomateriais (Diez et al., 2014). Suas desvantagens são relacionadas à limitada disponibilidade, à grande reabsorção e ao maior custo biológico associado à necessidade de uma área cirúrgica adicional como região doadora (Zizzari et al., 2016). Dentre os substitutos ósseos, o osso bovino inorgânico (OBI) é considerado uma opção recomendada, com disponibilidade ilimitada que permite simplificar o procedimento cirúrgico, sendo estas as suas principais vantagens (Aludden et al., 2018). Sua propriedade osteocondutora deve-se às suas partículas de tamanho variado, preservando o espaço dentro do tecido e servindo de suporte para a deposição e mineralização da matriz óssea (Kasuya et al., 2018).

Paralelamente, a Terapia à Laser de Baixa Potência (TLBP) se mostra como uma nova alternativa não invasiva para tratamento de lesões ósseas, estimulando a

osteogênese e reduzindo o tempo de reparo tecidual (Ghahroudi et al., 2014). Os mecanismos de ação do laser sobre o tecido ósseo em regeneração não estão esclarecidos, entretanto dados indicam que a absorção da luz por estruturas da membrana plasmática desencadeia uma sequência de reações bioquímicas que resultam em ativação de fatores de transcrição que modulam a migração celular, a mitose e o reparo tecidual (Kunimatsu et al., 2018).

A associação da TLBP ao OBI tem sido proposta como uma possibilidade de induzir propriedades regenerativas e de aumentar atividade osteoblástica, possibilitando maior formação de tecido mineralizado nas áreas irradiadas (de Almeida et al., 2014; Oliveira et al., 2014; Marques et al., 2015; Bosco et al., 2016; Acar et al., 2016; de Oliveira et al., 2018). Parece claro que a TLBP eleva o potencial osteocondutor desses biomateriais pela presença de maior percentagem de tecido ósseo neoformado (de Oliveira et al., 2018).

Dentre os parâmetros que compreendem o protocolo da TLBP, o comprimento de onda infravermelho é considerado mais adequado no tratamento das lesões ósseas, exibindo efeitos melhores em comparação ao espectro vermelho (Brassolatti et al., 2018). Embora ainda não exista uma padronização para cada um dos parâmetros utilizados na TLBP (tipo de emissor, potência, fluência, energia total e número de sessões), ainda assim os resultados positivos são relevantes (Santinoni et al., 2017; Brassolatti et al., 2018).

Sendo assim a proposta deste estudo é analisar o efeito da TLBP no reparo do tecido ósseo em DOC preenchido ou não com enxerto ósseo bovino inorgânico, em diferentes intervalos de tempo.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Aspectos Éticos e Amostra

Todos os procedimentos adotados envolvendo os animais foram iniciados após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES) protocolo n°. 010/2014. As normas citadas e adotadas se correlacionam àquelas estabelecidas na

regulamentação do uso de animais experimentais nas pesquisas realizadas na Comunidade Europeia.

Para evitar vieses decorrentes de fatores hormonais a amostra de 42 animais foi constituída exclusivamente por ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus albinus*), com peso corporal de 250 a 300 g mantidos em gaiolas individuais com condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C), umidade (50 ± 10 %) e ciclo claro/escuro de 12 h, com acesso à água e ração padrão sem restrições.

3.2.2 Delineamento do Estudo

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de acordo com os números de sessões de laserterapia: Grupo Controle não irradiado, grupo L4 (quatro sessões); L7 (sete sessões) e L11 (onze sessões). Os Grupos foram subdivididos em subgrupos (n=6) com períodos observacionais de 15 e 30 dias, totalizando 42 animais: Controle (C₁₅ e C₃₀); L4 (L4₁₅ e L4₃₀); L7 (L7₁₅ e L7₃₀) e L11 (L11₃₀). O grupo L11 foi observado apenas aos 30 dias devido à última sessão de TLBP ocorrer no vigésimo primeiro dia (Quadro 01).

Quadro 01 – Distribuição dos grupos de acordo com o número de sessões de Laserterapia e dos subgrupos por período de observação.

Grupos	Nº das Sessões de Laserterapia	Subgrupos por período de observação (dias)	
		15	30
Controle	0	C ₁₅	C ₃₀
Laser 4 (L4)	4	L4 ₁₅	L4 ₃₀
Laser 7 (L7)	7	L7 ₁₅	L7 ₃₀
Laser 11 (L11)	11	-	L11 ₃₀

3.2.3 Procedimento Cirúrgico

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições assépticas. A anestesia foi feita com associação de Cloridrato de Ketamina 50 mg / Kg (Instituto Biochimico Indústria Farmacêutica Ltda, Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) e Cloridrato de Xilazina 5 mg / Kg (Syntec do Brasil Ltda, Santana do Parnaíba, Brasil) por via

intraperitoneal. Procedeu-se à tricotomia da região compreendida entre os pavilhões auriculares externos na região superior da cabeça. A antissepsia da pele e da pelagem em torno dela foi realizada com solução aquosa de digluconato de clorexidina a 2%. Foi produzida uma incisão longitudinal sobre o crânio, ao longo da sutura sagital, medindo aproximadamente 2,5 cm e divulsão dos tecidos expondo a cortical óssea da calvária. Dois defeitos ósseos críticos (DOC) foram confeccionados lateralmente à sutura sagital, centralizada nos ossos parietais sem envolvimento das suturas circundantes (sagital, coronal e lambdoide) e com distância aproximada de 2 mm entre si (Figura 1). A osteotomia foi realizada com o auxílio de um motor elétrico (Driller, Carapicuíba, Brasil), com 1500 rotações por minuto, contra ângulo 20:1 (Kavo, Joinville, Brasil) e broca trefina (W&F Cirúrgicos, Barueri, Brasil) com diâmetro externo de 5 mm, sob refrigeração intensa de solução fisiológica estéril 0,9%. O rompimento das corticais externa e interna da calvária, ocorreu sem provocar lesão das meninges. Para controle da profundidade da craniectomia foi desenvolvido um dispositivo plástico adaptado à trefina (Figura 2). Em todos os grupos, o DOC direito foi espontaneamente preenchido com coágulo e o esquerdo com Bio-Oss[®] (Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça) nas granulações entre 0,25 mm a 1,0 mm, quantificado com o mesmo volume (14,7 µL), (Hallman & Thor, 2008; de Oliveira et al., 2018).

A pele e o periósteo foram suturados em plano único com pontos simples interrompidos, utilizando fio seda 3-0 (Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil). A área de aplicação da laserterapia foi demarcada, na pele, com caneta permanente (ponto de referência), na região diretamente sobre os defeitos ósseos. Após os procedimentos cirúrgicos e de laserterapia, os animais foram mantidos na posição de decúbito ventral em suas gaiolas identificadas para recuperação da anestesia. O controle da dor pós-operatória foi realizado com Tylenol[®] 200 mg / mL (Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda, São José dos Campos, Brasil) com dose de 30 gotas diluídas em 200 mL de água, disponível no bebedouro após o término do procedimento e mantido por três dias seguidos. Como antibioticoterapia foi ministrado no pós-operatório imediato, dose única de Enrofloxacino 2,5% 10 mg / kg (Vencofarma, Londrina, Brasil) por via subcutânea.

3.2.4 Laserterapia

O Laser utilizado foi o diodo de Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl), Laser Duo (MMOptics Ltda, São Carlos, Brasil). O protocolo de aplicação da TLBP foi baseado pelo proposto por Oliveira et al. (2014), iniciando as aplicações imediatamente após a sutura, de maneira transcutânea (ponteira apoiada sobre a pele), em intervalos de 48 h entre as sessões, totalizando 4, 7 ou 11 sessões, de acordo com o grupo.

Durante a laserterapia os animais foram sedados em câmara de inalação utilizando algodão embebido com 2,5 mL de Isoflurano[®] (Instituto Biochimico Indústria Farmacêutica Ltda, Itatiaia, Brasil). A fotobiomodulação do laser foi realizada no comprimento de onda infravermelho e densidade de energia de 200 J / cm² por sessão (808 nm, onda contínua, $\varnothing \sim 3 \text{ mm}^2$, 100 mW), com tempo de 60 segundos. A aplicação pontual transcutânea foi realizada com a ponteira apoiada sobre a pele região (Figura 1-D) de cada uma das cavidades cirúrgicas (direita e esquerda).

Alcançados os períodos observacionais pós-operatórios de 15 e 30 dias, os animais foram eutanasiados com dose letal de uma solução de Cloridrato de Xilazina 15 mg / kg a 30 mg / kg e Cloridrato de Ketamina 150 mg / kg a 225 mg / kg. Os procedimentos cirúrgicos e de eutanásia foram realizados pelo mesmo cirurgião. Após, as amostras teciduais da calvária, contendo toda a região dos DOCs, foram removidas e imediatamente armazenadas em recipientes plásticos rotulados contendo formalina neutra tamponada a 10% (Histopot-Serosep, County Limerick, Irlanda) para fixação.

3.2.5 Histologia e Análise Histomorfométrica

As amostras das calvárias foram descalcificadas em uma solução de ácido fórmico a 10% com trocas diárias por cinco dias consecutivos. O bloco ósseo foi dividido no sentido sagital pela área de maior diâmetro de cada uma das cavidades e, em seguida, submetido à série de banhos para processamento histológico. Realizou-se cortes seriados em micrótomo com espessura de 6 μm e seguiu-se protocolo padrão para coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Foi selecionado um corte histológico representando a região central de cada defeito ósseo, que foram microfotografados

por meio do microscópio Leica DM500 com câmera acoplada ICC50 HD (Leica Reichert & Jung Products, Wetzlar, Alemanha) com aumento de 10X. Na análise histomorfométrica, a área total e a área de osso mineralizado neoformado foram mensuradas com auxílio do programa Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Estados Unidos da América). Esta análise foi feita por avaliador previamente treinado e cego quanto aos grupos avaliados. A percentagem de tecido mineralizado em relação à área tecidual total foi calculada pela fórmula:

$$\%Tecido\ mineralizado = \frac{Média\ da\ área\ mineralizada}{Média\ da\ área\ tecidual\ total} \times 100.$$

3.2.6 Análise Microtomográfica

Os blocos ósseos das calvárias foram enviados ao Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica da Universidade Federal da Paraíba e escaneados por meio do microtomógrafo SkyScan 1172 (Bruker, Kontich, Belgium), utilizando o protocolo de escaneamento com os seguintes parâmetros: 80 kVp, 120 μ A, filtro de 0.5 Al, 14 μ m tamanho de voxel, 0.3° de *rotation step*, 3 frames e um giro de 180°. A reconstrução das imagens foi realizada no software NRecon (Bruker, Kontich, Belgium) com a aplicação da correção de artefato em 20% de redução de *beam hardening*. A reorientação do volume foi executada no software Dataviewer (Bruker, Kontich, Belgium). Para a análise do defeito foi utilizado o software CTAn (Bruker, Kontich, Belgium). Toda a região do defeito ósseo foi delimitada como uma estrutura em formato circular de 5 mm de diâmetro e a altura correspondente à espessura total da calvária (Figura 3). Foram avaliados os parâmetros de volume ósseo BV (mm^3), espessura trabecular Tb.Th (mm) e número de trabéculas Tb.N (1/mm). Sendo BV a relação entre o volume ósseo segmentado e o volume total da região de interesse, Tb.Th a média da espessura das trabéculas de toda a estrutura e Tb.N a medida do número médio de trabéculas por unidade de comprimento (Bouxein et al., 2010).

3.2.7 Análises Estatísticas

Os procedimentos bioestatísticos foram realizados por meio do *software* Prism 8.0 (GraphPad software, inc, USA).

Os dados foram primeiramente submetidos a três diferentes testes de normalidade (D' Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirov). Quando observada discrepância nos resultados destes testes optou-se por seguir a concordância apresentada por dois dos três testes aplicados. O resultado desta análise mostrou que o conjunto de dados apresentou uma distribuição Gaussiana e, portanto, utilizou-se para análise bioestatística o teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) de uma via. Quando detectada significância ($p < 0,05$) foi utilizado o teste *post hoc* de múltiplas comparações de Tukey. As diferenças entre as médias dos grupos foram consideradas significantes quando observado um valor $p < 0,05$.

Foram calculados os coeficientes Kappa de Cohen para o nível da reprodutibilidade intra e interexaminadores na análise histológica qualitativa. A interpretação dos valores obtidos seguiu os critérios descritos por Landis-Koch, (1977): reprodutibilidade pobre (< 0), reprodutibilidade fraca (0 - 0,2), reprodutibilidade razoável (0,21 – 0,40), reprodutibilidade moderada (0,22 - 0,60), reprodutibilidade substancial (0,61 – 0,80), reprodutibilidade quase perfeita (0,81 – 1,0).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Análise qualitativa das lâminas histológicas- Nível de reprodutibilidade

O coeficiente Kappa de Cohen para reprodutibilidade interexaminadores foi de 0,83 e intraexaminador de 0,81, ambos classificados como quase perfeito (Landis & Koch, 1977).

3.3.2 Histologia das Cavidades Preenchidas por Coágulo

A regeneração do tecido ósseo não foi completa nos períodos de observação, independentemente dos subgrupos. Ao final de 30 dias verificou-se menor presença de tecido fibroso.

3.3.2.1 Grupo Controle

Uma pequena quantidade de matriz óssea mineralizada foi observada nas margens e em alguns pontos centrais das cavidades ósseas. Os espécimes apresentavam

grande quantidade de tecido conjuntivo com fibras colágenas paralelas ao perióstio. Atividade osteoblástica limitada nas margens e regiões centrais em comparação aos grupos experimentais.

3.3.2.2 Grupos Experimentais

Todos os grupos tratados com a TLBP apresentaram resultados semelhantes. Em comparação ao grupo controle, os espécimes mostraram maior deposição e mineralização de matriz óssea tanto nas margens quanto na região mais central dos DOC, com presença de áreas mineralizadas formando pontes de tecido ósseo em direção à região central com maior tendência ao fechamento completo da lesão (Figura 4). Atividade osteoblástica mais intensa e menor presença de tecido conjuntivo em comparação aos grupos controles nos dois tempos observacionais.

3.3.3 Histologia das Cavidades Preenchidas por OBI

Observou-se, independentemente do grupo, que a presença do biomaterial permitiu formação de tecido com espessura semelhante ao osso circundante e com neoformação de tecido ósseo por toda a extensão da cavidade óssea.

3.3.3.1 Grupo Controle

Aos 15 dias, as partículas do biomaterial apresentavam-se distribuídas por toda área do defeito, envoltas por tecido conjuntivo organizado com fibras colágenas paralelas, presença de osteoblastos e novos vasos sanguíneos. Em algumas áreas, presença de osteoclastos ao redor das partículas do biomaterial. Discreta presença de áreas de mineralização nas margens do DOC. Aos 30 dias, pôde-se notar maior mineralização da matriz depositada ao redor e entre as partículas do OBI. Visualizou-se moderada mineralização na região central do DOC.

3.3.3.2 Grupos Experimentais

Todos os grupos tratados pela TLBP responderam de forma semelhante às sessões de tratamento. Grande presença de tecido conjuntivo organizado com fibras

colágenas paralelas, intensa atividade osteoblástica e numerosos vasos sanguíneos. Em 15 dias, moderada presença de áreas mineralizadas nas margens e poucas ilhas de mineralização nas bordas e entre as partículas. Em 30 dias, maior presença de matriz em mineralização nas margens do defeito e também em direção ao centro do DOC original. Além disso, observou-se deposição de matriz mineralizada sobre as partículas, entre elas e dentro de algumas porosidades do biomaterial (Figura 5).

3.3.4 Análise Histomorfométrica

Os valores das percentagens da área mineralizada dos subgrupos foram analisados e estão apresentados na figura 6.

Nas cavidades preenchidas com coágulo, em 15 dias (Figura 7), as medições das áreas em mineralização revelaram uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) com maior formação de tecido ósseo no grupo L7₁₅ (49,75%) em comparação ao grupo C₁₅ (26,97%), (Figura 6-A). Entretanto, em 30 dias houve uma tendência a maior formação tecidual no grupo L7₃₀ (65,7%), comparado ao grupo L4₃₀ (59,84%) e C₃₀ (58,65%), mas sem diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 6-C).

Nas áreas preenchidas com OBI, em 15 dias, houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$), com maior formação de tecido ósseo nos grupos L4 (30,55%) e L7 (35,12%) comparados ao grupo C (22,3%), entretanto não houve diferença estatística significativa entre os grupos L4 e L7 ($p > 0,05$) (Figura 6-B). No período de 30 dias (Figura 8) houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre grupos L7 (51,94%) e L11 (52,19%) comparados ao grupo C (37,38%), todavia não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os grupos L4, L7 e L11 (46,75%) (Figura 6-D).

3.3.5 Análise Microtomográfica

Na análise estatística da avaliação microtomográfica das amostras, para os parâmetros avaliados não foram detectadas diferenças significantes na ANOVA para o volume de tecido ósseo neoformado, número de trabéculas e espessura das

trabéculas, não evidenciando diferenças estatísticas significativas ($p>0,05$) entre os grupos, tanto para os tempos de 15 e 30 dias após a cirurgia nas cavidades preenchidas com coágulo (tabela 1) ou com OBI (tabela 2).

Tabela 1. Parâmetros microtomográficos do tecido ósseo neoformado nas cavidades preenchidas com coágulo.

	C ₁₅	L4 ₁₅	L7 ₁₅	C ₃₀	L4 ₃₀	L7 ₃₀	L11 ₃₀
Volume ósseo (M em mm ³ ±Dp)	1.855 ±0.73	2.187 ±0.94	1.872 ±0.89	4.829 ±1.31	2.941 ±1.24	4.238 ±0.79	4.037 ±0.52
Espessura trabecular (M em mm ±Dp)	0.151 ±0.02	0.201 ±0.11	0.158 ±0.09	0.245 ±0.05	0.233 ±0.02	0.213 ±0.01	0.240 ±0.02
Número de trabéculas (M em mm ⁻¹ ±Dp)	0.043 ±0.02	0.039 ±0.01	0.042 ±0.01	0.067 ±0.01	0.043 ±0.01	0.067 ±0.01	0.057 ±0.01

(M) Média, (Dp) Desvio padrão.

Tabela 2. Parâmetros microtomográficos do tecido ósseo neoformado nas cavidades preenchidas com osso bovino inorgânico.

	C ₁₅	L4 ₁₅	L7 ₁₅	C ₃₀	L4 ₃₀	L7 ₃₀	L11 ₃₀
Volume ósseo (M em mm ³ ±Dp)	4.149 ±1.55	4.164 ±0.93	4.509 ±0.64	5.225 ±2.34	3.41 ±0.83	4.627 ±0.89	3.45 ±0.53
Espessura trabecular (M em mm ±Dp)	0.096 ±0.02	0.128 ±0.04	0.101 ±0.02	0.223 ±0.09	0.162 ±0.03	0.184 ±0.06	0.165 ±0.05
Número de trabéculas (M em mm ⁻¹ ±Dp)	0.144 ±0.04	0.115 ±0.01	0.156 ±0.03	0.081 ±0.02	0.073 ±0.01	0.088 ±0.01	0.074 ±0.01

(M) Média, (Dp) Desvio padrão.

3.4 DISCUSSÃO

Apesar de não haver consenso na literatura sobre o tamanho ideal dos DOC em calvária de ratos, a literatura prévia considera 5 mm de diâmetro suficientes, evitando, desta forma, a completa regeneração óssea em um curto período de tempo (Vajgel et al., 2014; de Almeida et al., 2014; Brassolatti et al., 2018). A opção pela confecção de duas cavidades ósseas em cada calvária permitiu a avaliação do efeito da TLBP sobre o coágulo e OBI ao mesmo tempo em cada animal, reduzindo a incorporação de viés relacionado às variações entre diferentes animais (Vajgel et al., 2014). As análises histológicas deste estudo demonstram que em qualquer das cavidades preenchidas com coágulo não houve completa formação de tecido ósseo mineralizado, mesmo no período de 30 dias pós-cirúrgicos, corroborando com estes achados prévios.

Atualmente não há consenso sobre o protocolo ideal para a aplicação da TLBP na reparação de tecidos ósseos (Cunha et al., 2014; Noba et al., 2018), com uma grande variação nos parâmetros em estudos experimentais (Brassolatti et al., 2018). A presente pesquisa utilizou os mesmos parâmetros dosimétricos por ponto de aplicação (comprimento de onda, tempo de aplicação e energia por sessão) testado em estudos anteriores (Cunha et al., 2014; de Almeida et al., 2014; Moreira et al., 2018), porém objetivando avaliar o efeito do número de sessões de TLBP sobre a neoformação óssea, optou-se por realizar todas as aplicações de maneira transcutânea, a fim de facilitar a sua reprodutibilidade clínica e reduzir a incorporação de possíveis vieses associados a uma primeira aplicação em campo aberto, diretamente sobre as margens do tecido ósseo exposto.

A análise histomorfométrica é considerada padrão-ouro na avaliação da cicatrização óssea, mensurando indiretamente a atividade celular nesses tecidos ao quantificar a porcentagem de osso neoformado (Pinheiro et al., 2012; Acar et al., 2015). Paralelamente, o exame microtomográfico é descrito como uma opção para se aferir o volume de tecido ósseo em *ex vivo* e uma alternativa viável no estudo do processo de reparo de tecidos duros, com resultados muitas vezes equiparados aos encontrados na análise histomorfométrica (Schmidt et al., 2003; Schambach et al., 2010). O presente estudo avaliou o volume de tecido ósseo mineralizado neoformado e parâmetros trabeculares de número e espessura. De um modo geral, a análise microtomográfica foi capaz de identificar a neoformação óssea no interior das cavidades ósseas nos dois tempos observacionais de 15 e 30 dias, com grande precisão. Entretanto, os resultados desta pesquisa em ambos os tempos não evidenciaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, com consequente ausência do benefício aos grupos tratados pela TLBP em comparação ao grupo controle. Em relação ao efeito da TLBP no reparo ósseo, este achado diverge de grande parte da literatura prévia os quais evidenciaram o efeito positivo da TLBP sobre as regiões tratadas em calvária de ratos (Cunha et al., 2014; de Almeida et al., 2014; Marques et al., 2015; Bosco et al., 2016; Moreira et al., 2018), em contrapartida está em concordância com estudo prévio (Nagata et al., 2013) no qual ao limite de 30 dias pós-operatórios os autores também não observaram melhores resultados de quantidade de tecido ósseo formado nos grupos tratados apenas com TLBP em comparação ao grupo controle. Contudo, em nenhum destes

estudos foi utilizada a avaliação microtomográfica. Somado a essa constatação, em recente revisão sistemática sobre os efeitos da TLBP aplicadas em calvária de ratos (Brassolatti et al., 2018), a avaliação microtomográfica das amostras como método de análise não foi utilizada em nenhum dos estudos incluídos nesta revisão. Dessa forma a escassez de estudos com similar análise evidencia o caráter particular pelo qual os resultados aqui obtidos devem ser interpretados. Portanto, acredita-se que este resultado diverso ocorreu principalmente em decorrência das diferenças metodológicas existentes, já que em grande parte dos estudos a análise das amostras foi feita de forma quantitativa por meio da histomorfometria (Cunha et al., 2014; de Almeida et al., 2014; Marques et al., 2015; Bosco et al., 2016; Moreira et al., 2018). Diferentemente da avaliação em duas dimensões na histomorfometria, na imagem tridimensional da microtomografia para o volume total de osso formado, os valores que são identificados na região central das imagens histológicas, podem ser insignificantes para o volume total captado pela microtomografia.

Adicionalmente, alguns aspectos técnicos na análise das imagens microtomográficas podem interferir nos resultados obtidos durante a mensuração dos parâmetros avaliados (Schanbach et al., 2010). Um fator de grande relevância é o tamanho da área total durante a seleção da região de interesse, o qual tem influência direta sobre os parâmetros microestruturais mensurados (espessura e número de trabéculas), bem como sobre o volume total de tecido ósseo formado (Chatterjee et al., 2017). Assim, a presente análise foi feita utilizando as dimensões padronizadas (5 mm) e espessura total para delimitação da região de interesse, aplicando-se o mesmo método para todas as amostras de imagens a fim de evitar a incorporação de vieses de seleção. De fato, em estudo anterior (Lazemby et al., 2011), foram observadas alterações nos parâmetros trabeculares quando não houve a aplicação da mesma área de seleção na área de interesse. Ainda, com relação à seleção da região de interesse, um pequeno deslocamento mesmo que micrométrico durante a determinação de seus limites podem incorporar margens de tecido ósseo nativo da calvária além do defeito original e resultar em mudanças de 1 a 13% nos valores de volume ósseo formado (Whithouse et al., 1974; Chatterjee et al., 2017) sendo esta uma limitação do presente estudo.

Outra consideração importante relaciona-se à aquisição da imagem em pequenos animais nos quais as dimensões reduzidas dos ossos e conseqüentemente suas estruturas teciduais, exigem a produção de imagens de alta qualidade que permitam identificar precisamente os detalhes existentes (Chatterjee et al., 2017). Desse modo, a escolha do tamanho do voxel é fundamental para permitir medições confiáveis, já que as estruturas trabeculares em ratos variam entre 20 e 60 nanômetros e as diferenças nos tamanhos dos voxels podem levar à subestimação (gerado pelo efeito de volumes parciais) e superestimação do objeto. Em tais cenários a proporção dos voxels ao tamanho do objeto deve ser quanto mais justa possível para elevar a precisão das medidas (Bouxsein et al., 2010; Chatterjee et al., 2017). As microtomografias analisadas no presente estudo tem o tamanho de voxel 14 μm , o que apresenta resolução alta o suficiente para obter medições precisas de forma confiável.

Outra hipótese para a não identificação de diferenças entre os grupos nesta análise é de que o exame de microtomografia não tenha sensibilidade suficiente para identificar as diferenças nos estágios iniciais de 15 e 30 dias, período em que a mineralização da matriz ainda não está completa (Schambach et al., 2010; Ramalingam et al., 2016; de Oliveira et al., 2018). De maneira semelhante, em recente estudo sobre a utilização da associação da TLBP na regeneração óssea em calvária de ratos, a análise microtomográfica sequencial *in vivo* somente foi capaz de identificar as diferenças entre os grupos após quatro meses pós-operatórios (Wang et al., 2018).

A análise histomorfométrica das cavidades preenchidas com coágulo apresenta um indicativo de que o maior número de sessões acelerou a formação de tecido ósseo durante a fase inicial de cicatrização, se estabilizando posteriormente. Estes resultados indicam que a TLBP foi mais eficaz nos estágios iniciais do processo cicatricial em que ocorre intensa proliferação de células do que nas fases de deposição e mineralização da matriz óssea (Ozawa et al., 1998; Matsumoto et al., 2009; Marques et al., 2015). Foi identificado que TLBP foi capaz de ampliar a formação de tecido ósseo nas áreas preenchidas com coágulo e OBI (Ghahroudi et al., 2014; Cunha et al., 2014, de Oliveira et al., 2018). Ainda sobre as áreas com OBI, após 15 dias, a TLBP promoveu maior quantidade de tecido ósseo em ambos

os grupos experimentais, L4 (30,55%) e L7 (35,12%) mostrando percentagens maiores de área total mineralizada em comparação ao grupo controle (22,3%) ($p < 0,05$), porém sem diferenças significantes entre os dois grupos experimentais ($p > 0,05$), revelando não haver vantagens de um maior número de sessões sobre a quantidade de tecido ósseo formado neste período. Nas amostras avaliadas aos 30 dias, os grupos L7 (51,94%) e L11 (52,19%) apresentaram aumento na quantidade de tecido mineralizado em comparação com o grupo controle (37,38%). O fato de, ao final de 30 dias, o grupo L4 não mostrar efeito positivo quando comparado ao grupo controle indica que um número mínimo de sessões foi necessário para elevar significativamente a quantidade de tecido ósseo formado. Por outro lado, ausência de diferença entre os grupos L7 e L11 mostra que aumento no número de aplicações permitiu ganhos sobre a quantidade de tecido mineralizado formado com tendência a estabilização após sete sessões não exibindo melhor efeito em onze sessões.

Com a comparação da análise histomorfométrica das cavidades preenchidas com coágulo ou com OBI pode-se deduzir que exista um limite biológico de resposta ao estímulo gerado pela TLBP sobre o coágulo (Acar et al., 2016), no qual não se obtém efeito a partir de certo número de sessões com intervalos de 48 h. Diferentemente, sobre as áreas preenchidas com OBI que obtiveram um efeito positivo em 15 e 30 dias. Neste cenário, é possível que a combinação entre as propriedades osteocondutoras e de manutenção do espaço para regeneração tecidual oferecidos pelo biomaterial, somado aos efeitos da TLBP sobre neovascularização, atividade osteoblástica (Barbosa et al., 2013) e estimulação na produção de matriz óssea (Alghamdi et al., 2012), possa gerar indiretamente, algum potencial osteoindutor ao OBI (Aboelsaad et al., 2009; Cunha et al., 2014) que permitiu a contínua formação óssea. No entanto, a ausência de diferenças estatísticas significantes entre os grupos L4 e L7 em 15 dias e L7 e L11 em 30 dias podem indicar um limite temporal, sobre o qual os estímulos adicionais gerados pelo aumento do número de sessões não resultam em vantagens para a formação de maior quantidade de tecido mineralizado.

3.5 CONCLUSÃO

Pelo desenho experimental apresentado nesta pesquisa podemos concluir que a variação no número de sessões de laserterapia interfere sobre quantidade de tecido ósseo formado nos estágios iniciais do processo de reparo ósseo. A análise microtomográfica não mostrou diferenças nos parâmetros ósseos avaliados. A associação entre OBI e TLBP permitiu efeito positivo da laserterapia com maior neoformação óssea em ambos os tempos observados. Foi possível observar a existência de um número mínimo de sessões de TLBP efetivo bem como um limite sobre o qual não se obtém melhores resultados.

REFERÊNCIAS

Aboelsaad, N. S., Soory, M., Gadalla, L. M. A., Ragab, L. I., Dunne, S., Zalata, K. R., & Louca, C. (2009). Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study). *Lasers in Medical Science*, 24(3), 387–395. <http://doi.org/10.1007/s10103-008-0576-9>

Acar, A. H., Yolcu, Ü., Altindiş, S., Gül, M., Alan, H., & Malkoç, S. (2016). Bone regeneration by low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound therapy in the rabbit calvarium. *Archives of Oral Biology*, 61, 60–65. <http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.10.011>

Acar, A. H., Yolcu, Ü., Gül, M., Keleş, A., Erdem, N. F., & Altundag Kahraman, S. (2015). Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. *Archives of Oral Biology*, 60(4), 606–614. <http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.09.017>

AlGhamdi, K. M., Kumar, A., & Moussa, N. A. (2012). Low-level laser therapy: A useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers in Medical Science*. <http://doi.org/10.1007/s10103-011-0885-2>

Aludden, H., Dahlin, A., Christer, T. S., Dahlin, C., & Mordenfeld, A. (2018). Histomorphometric analyses of area fraction of different ratios of Bio Oss® and bone prior to grafting procedures – An in vitro study to demonstrate a baseline. *Clinical Oral Implants Research*, 29, 185–191. <http://doi.org/10.1111/clr.13079>

Barbosa, D., De Souza, R. A., Xavier, M., Da Silva, F. F., Arisawa, E. Â. L., & Villaverde, A. G. J. B. (2013). Effects of low-level laser therapy (LLLT) on bone repair in rats: Optical densitometry analysis. *Lasers in Medical Science*, 28(2), 651–656. <http://doi.org/10.1007/s10103-012-1125-0>

Bosco, A. F., Faleiros, P. L., Carmona, L. R., Garcia, V. G., Theodoro, L. H., de Araujo, N. J., et al. (2016). Effects of low-level laser therapy on bone healing of critical-size defects treated with bovine bone graft. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 163, 303–310. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.040>

Bouxsein, M. L., Boyd, S. K., Christiansen, B. A., Guldberg, R. E., Jepsen, K. J., & Muller, R. (2010). Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro – Computed Tomography Purpose of Guidelines. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(7), 1468–1486. <http://doi.org/10.1002/jbmr.141>

Brassolatti, P., de Andrade, A. L. M., Bossini, P. S., Orth, D. L., Duarte, F. O., Souza, A. B. dos A., et al. (2018). Photobiomodulation on critical bone defects of rat calvaria: a systematic review. *Lasers in Medical Science*, 33, 1841–1848. <http://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10103-018-2653-z>

Chatterjee, M., Faot, F., Correa, C., Duyck, J., Naert, I., & Vandamme, K. (2017). A robust methodology for the quantitative assessment of the rat jawbone microstructure. *International Journal of Oral Science*, 9(2), 87–94. <http://doi.org/10.1038/ijos.2017.11>

Cunha, M. J. S., Esper, L. A., Sbrana, M. C., de Oliveira, P. G. F. P., do Valle, A. L., & de Almeida, A. L. P. F. (2014). Effect of Low-Level Laser on Bone Defects Treated with Bovine or Autogenous Bone Grafts: In Vivo Study in Rat Calvaria. *BioMed Research International*, 2014(1), 1–9. <http://doi.org/10.1155/2014/104230>

de Almeida, A. L. P. F., Medeiros, I. L., Cunha, M. J. S., Sbrana, M. C., de Oliveira, P. G. F. P., & Esper, L. A. (2014). The effect of low-level laser on bone healing in critical size defects treated with or without autogenous bone graft: An experimental study in rat calvaria. *Clinical Oral Implants Research*, 25(10), 1131–1136. <http://doi.org/10.1111/clr.12239>

de Oliveira, G. J. P. L., Aroni, M. A. T., Medeiros, M. C., Marcantonio, E., & Marcantonio, R. A. C. (2018). Effect of low-level laser therapy on the healing of sites grafted with coagulum, deproteinized bovine bone, and biphasic ceramic made of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate. In vivo study in rats. *Lasers in Surgery and Medicine*, 50(6), 651–660. <http://doi.org/10.1002/lsm.22787>

Diez, G. F., Fontão, F. N. G. K., Bassi, A. P. F., Gama, J. C., & Claudino, M. (2014). Tomographic follow-up of bone regeneration after bone block harvesting from the mandibular ramus. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 43(3), 335–340. <http://doi.org/10.1016/j.ijom.2013.08.010>

Ghahroudi, A. A. R., Rokn, A. R., Kalhorii, Katayoun A. M. Khorsand, A., Pournabi, A., B., P. A. L., Reza, F., & Fekrazad, A. (2014). 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 in Medical Science*, *29*, 925–932. <http://doi.org/10.1007/s10103-013-1403-5>

Hallman, M., & Thor, A. (2008). Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontology 2000*.

Kasuya, S., Kato-Kogoe, N., Omori, M., Yamamoto, K., Taguchi, S., Fujita, H., et al. (2018). New Bone Formation Process Using Bio-Oss and Collagen Membrane for Rat Calvarial Bone Defect. *Implant Dentistry*, *27*(2), 158–164. <http://doi.org/10.1097/ID.0000000000000738>

Kunimatsu, R., Gunji, H., Tsuka, Y., Yoshimi, Y., Awada, T., Sumi, K., et al. (2018). Effects of high-frequency near-infrared diode laser irradiation on the proliferation and migration of mouse calvarial osteoblasts. *Lasers in Medical Science*, *33*(5), 959–966. <http://doi.org/10.1007/s10103-017-2426-0>

Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, *33*(1), 159–174.

Lazenby, R. A., Skinner, M. M., Kivell, T. L., & Hublin, J. (2011). Scaling VOI Size in 3D I CT Studies of Trabecular Bone: A Test of the Over-Sampling Hypothesis. *American Journal of Physical Anthropology*, *144*(1), 196–203. <http://doi.org/10.1002/ajpa.21385>

Marques, L., Holgado, L. A., Francischone, L. A., Ximenez, J. P. B., Okamoto, R., & Kinoshita, A. (2015). New LLLT protocol to speed up the bone healing process—histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. *Lasers in Medical Science*, *30*(4), 1225–1230. <http://doi.org/10.1007/s10103-014-1580-x>

Matsumoto, M. A., Ferino, R. V, Monteleone, G. F., & Ribeiro, D. A. (2009). Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats.

Lasers in Medical Science, 24(2), 195–201. <http://doi.org/10.1007/s10103-008-0544-4>

Moreira, G. S., Alves, P. H. M., Esper, L. A., Sbrana, M. C., Dalben, G. da S., Neppelenbroek, K. H., & de Almeida, A. L. P. F. (2018). Effect of Low-Level Laser on the Healing of Bone Defects Filled with Autogenous Bone or Bioactive Glass: In Vivo Study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 33(1), 169–174. <http://doi.org/10.11607/jomi.5900>.

Nagata, M. J. H., Santinoni, C. S., Pola, N. M., Campos, N. De, Messoria, M. R., Bomfim, S. R. M., ... Bosco, A. F. (2013). Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy : A new therapeutic approach to enhance bone healing. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 121(1), 6–14. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.01.013>

Noba, C., Mello-Moura, A. C. V., Gimenez, T., Tedesco, T. K., & Moura-Netto, C. (2018). Laser for bone healing after oral surgery: systematic review. *Lasers in Medical Science*, 33(3), 667–674. <http://doi.org/10.1007/s10103-017-2400-x>

Oliveira, A. M. de, Castro-Silva, I. I., Fernandes, G. V. D. O., Melo, B. R., Alves, A. T. N. N., Silva Júnior, A., et al. (2014). Effectiveness and acceleration of bone repair in critical-sized rat calvarial defects using low-level laser therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*, 46(1), 61–67. <http://doi.org/10.1002/lsm.22198>

Ozawa, Y., Shimizu, N., Kariya, G., & Abiko, Y. (1998). Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone*, 22(4), 347–354. [http://doi.org/10.1016/S8756-3282\(97\)00294-9](http://doi.org/10.1016/S8756-3282(97)00294-9)

Pinheiro, A. L. B., Soares, L. G. P., Barbosa, A. F. S., Ramalho, L. M. P., & Dos Santos, J. N. (2012). Does LED phototherapy influence the repair of bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration? A description of the repair process on rodents. *Lasers in Medical Science*, 27(5), 1013–1024. <http://doi.org/10.1007/s10103-011-1033-8>

Ramalingam, S., Al-Rasheed, A., ArRejaie, A., Nooh, N., Al-Kindi, M., & Al-Hezaimi, K. (2016). Guided bone regeneration in standardized calvarial defects using beta-tricalcium phosphate and collagen membrane: a real-time in vivo micro-computed tomographic experiment in rats. *Odontology*, *104*(2), 199–210. <http://doi.org/10.1007/s10266-015-0211-8>

Reininger, D., Cobo-Vázquez, C., Monteserín-Matesanz, M., & López-Quiles, J. (2016). Complications in the use of the mandibular body, ramus and symphysis as donor sites in bone graft surgery. A systematic review. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. <http://doi.org/10.4317/medoral.20938>

Santinoni, C. dos S., Oliveira, H. F. F., Batista, V. E. de S., Lemos, C. A. A., & Verri, F. R. (2017). Influence of low-level laser therapy on the healing of human bone maxillofacial defects: A systematic review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *169*, 83–89. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.03.004>

Schambach, S. J., Bag, S., Schilling, L., Groden, C., & Brockmann, M. A. (2010). Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods*, *50*(1), 2–13. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.08.007>

Schmidt, C., Priemel, M., Kohler, T., Weusten, A., Müller, R., Amling, M., & Eckstein, F. (2003). Precision and accuracy of peripheral quantitative computed tomography (pQCT) in the mouse skeleton compared with histology and microcomputed tomography (μ CT). *Journal of Bone and Mineral Research*, *18*(8), 1486–1496. <http://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.8.1486>

Schmitz, J. P., & Hollinger, J. O. (1986). The Critical Size Defect as an Experimental Model for Craniomandibulofacial Nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *205*(1), 299–308

Tarride, J. E., Burke, N., Leslie, W. D., Morin, S. N., Adachi, J. D., Papaioannou, A., et al. (2016). Loss of health related quality of life following low-trauma fractures in the elderly. *BMC Geriatrics*, *16*(1), 1–11. <http://doi.org/10.1613/jair.3680>

Vajgel, A., Mardas, N., Farias, B. C., Petrie, A., Cimões, R., & Donos, N. (2014). A systematic review on the critical size defect model. *Clinical Oral Implants Research*, 25(8), 879–893. <http://doi.org/10.3346/jkms.2015.30.5.569>

Wang, Y. H., Wu, J. Y., Kong, S. C., Chiang, M. H., Ho, M. L., Yeh, M. L., & Chen, C. H. (2018). Low power laser irradiation and human adipose-derived stem cell treatments promote bone regeneration in critical-sized calvarial defects in rats. *PLoS ONE*, 13(4), 1–18. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0195337>

Wijbenga, J. G., Schepers, R. H., Werker, P. M. N., Witjes, M. J. H., & Dijkstra, P. U. (2016). A systematic review of functional outcome and quality of life following reconstruction of maxillofacial defects using vascularized free fibula flaps and dental rehabilitation reveals poor data quality. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 69(8), 1024–1036. <http://doi.org/10.1016/j.bjps.2016.05.003>

Whitehouse, W. J., & Dyson, E. D. (1974). Scanning electron microscope studies of trabecular bone in the proximal end of the human femur. *J. Anat.*, 118(3), 417–444.

Zizzari, V. L., Zara, S., Tetè, G., Vinci, R., Gherlone, E., & Cataldi, A. (2016). Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/j.oooo.2016.04.010>

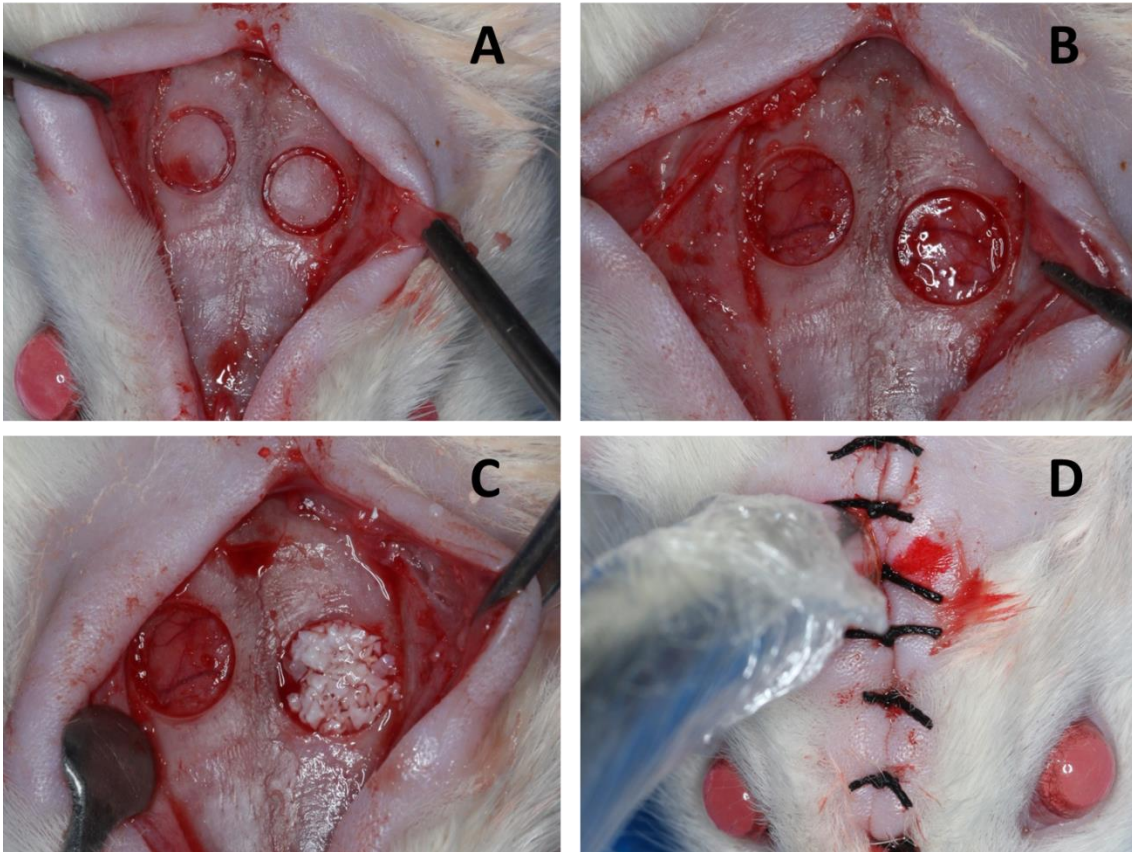


Figura 1: (A) Craniotomia para a realização do DOC; (B) Imagem da dura-máter íntegra; (C) OBI preenchendo a DOC esquerda; (D) Demarcação da área sobre a cavidade e fotobiomodulação após a sutura.

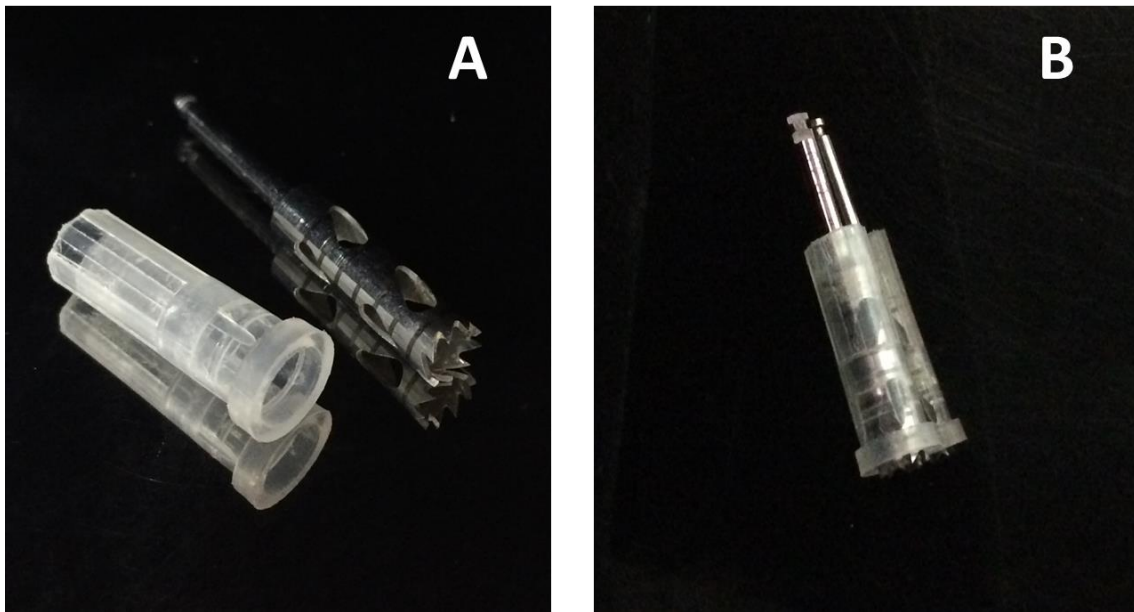


Figura 2: (A) Dispositivo plástico e broca trefina; (B) Dispositivo acoplado à broca possibilitando limitar a profundidade de corte da ponta ativa.

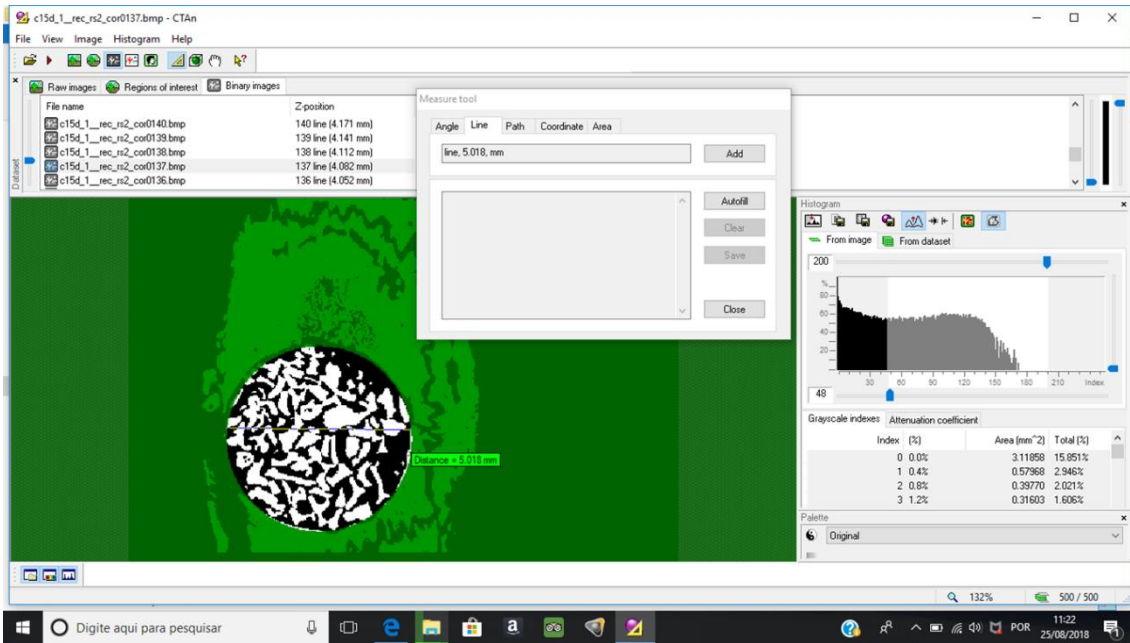


Figura 3: Seleção da área total do defeito ósseo preenchido com OBI para mensuração dos parâmetros avaliados pelo software CTAn.

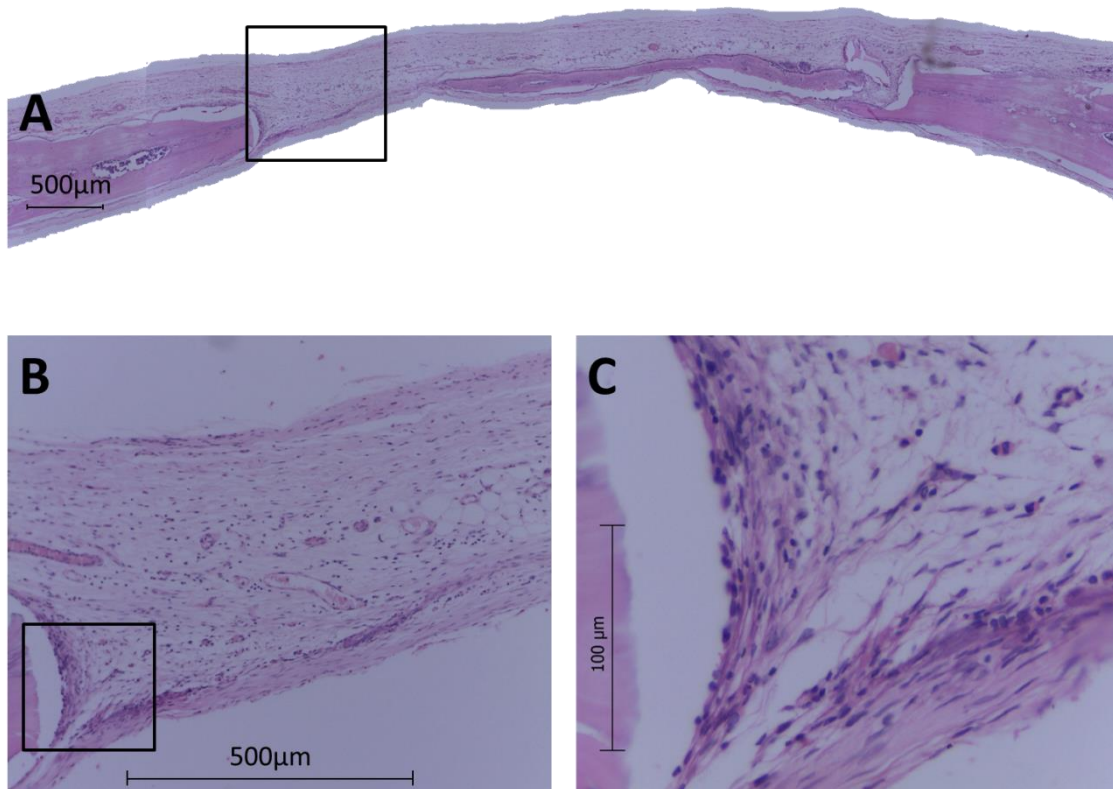


Figura 4: (A) Visão panorâmica da região de maior diâmetro (5 mm) do DOC preenchido por coágulo (Grupo L7 / 15 dias) e aspectos histológicos: deposição e mineralização de matriz óssea tanto nas margens quanto na região mais central dos defeitos cirúrgicos, com presença de áreas mineralizadas formando pontes de tecido ósseo em direção à região central com maior tendência ao fechamento completo da lesão; (B, C) Atividade osteoblástica e fibroblástica intensa na borda da lesão com deposição de matriz óssea e fibras colágenas. Lâminas coradas por HE, magnificação de 10X (A, B) e 40X (C).

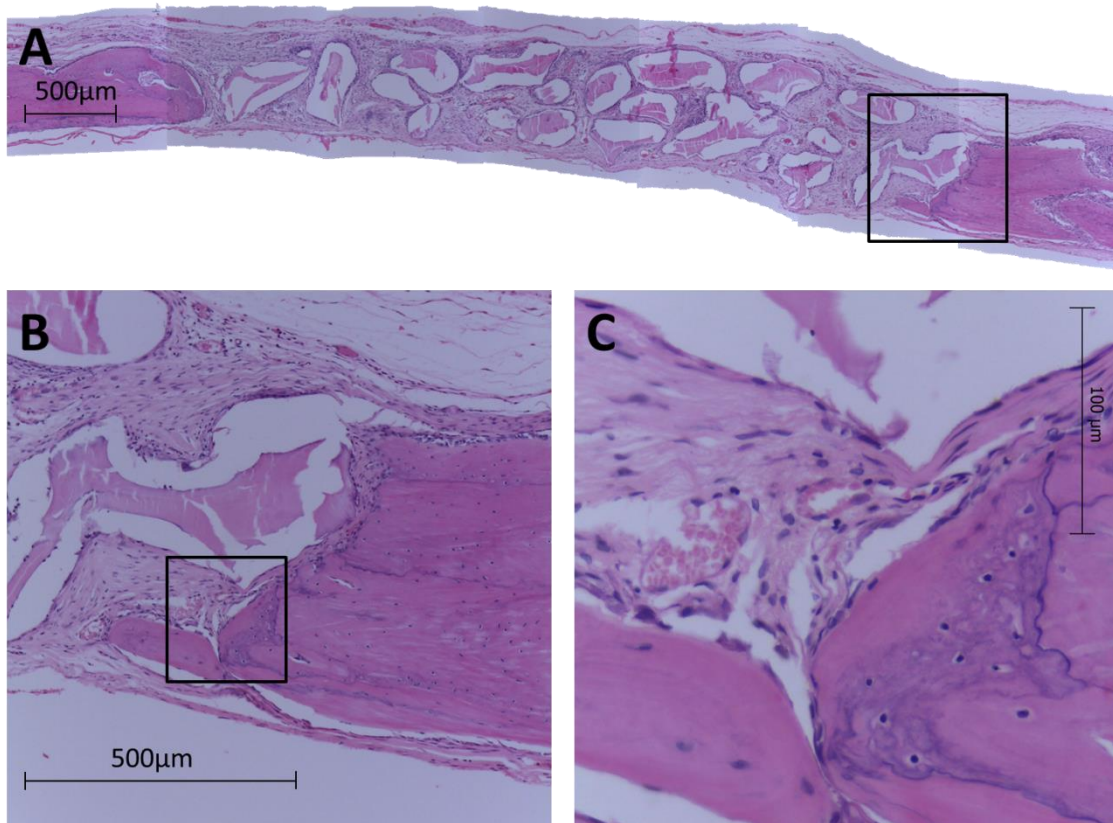


Figura 5: (A) Visão panorâmica da região de maior diâmetro (5 mm) do DOC preenchido com OBI (Grupo L7 / 30 dias) e aspectos histológicos: presença das partículas do biomaterial e formação de tecido osteóide por toda a área com espessura semelhante ao osso circundante; (B, C) Partícula de OBI envolta por osteoblastos com produção e mineralização de matriz óssea. Lâminas coradas por HE, magnificação de 10X (A, B) e 40X (C).

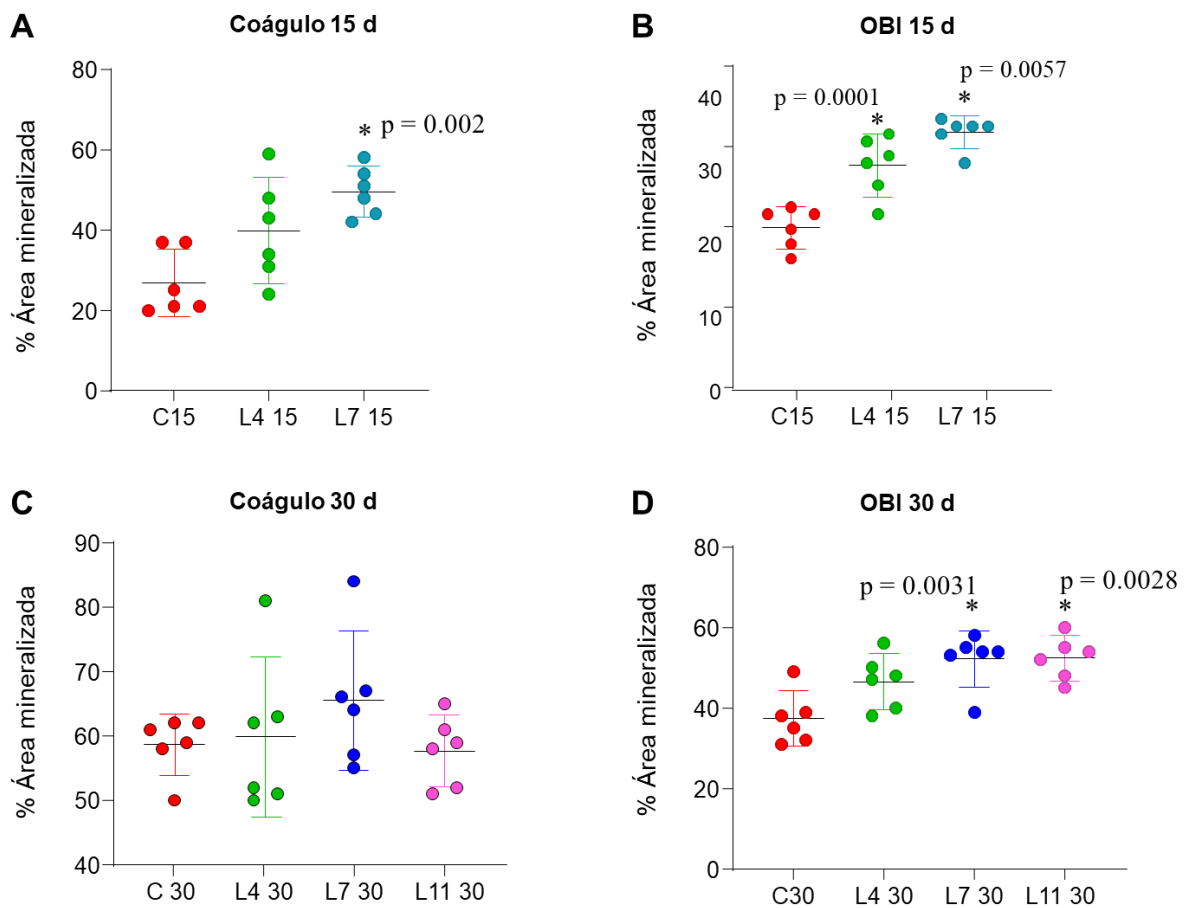


Figura 6. Gráfico de dispersão da percentagem da área mineralizada nas cavidades preenchidas por coágulo sanguíneo, nos grupos controle e submetidos à laserterapia no pós-cirúrgico de 15 dias (A) e 30 dias (C) e das cavidades preenchidas com OBI com pós-cirúrgico de 15 dias (B) e 30 dias (D). (*p<0,05 vs. controle).

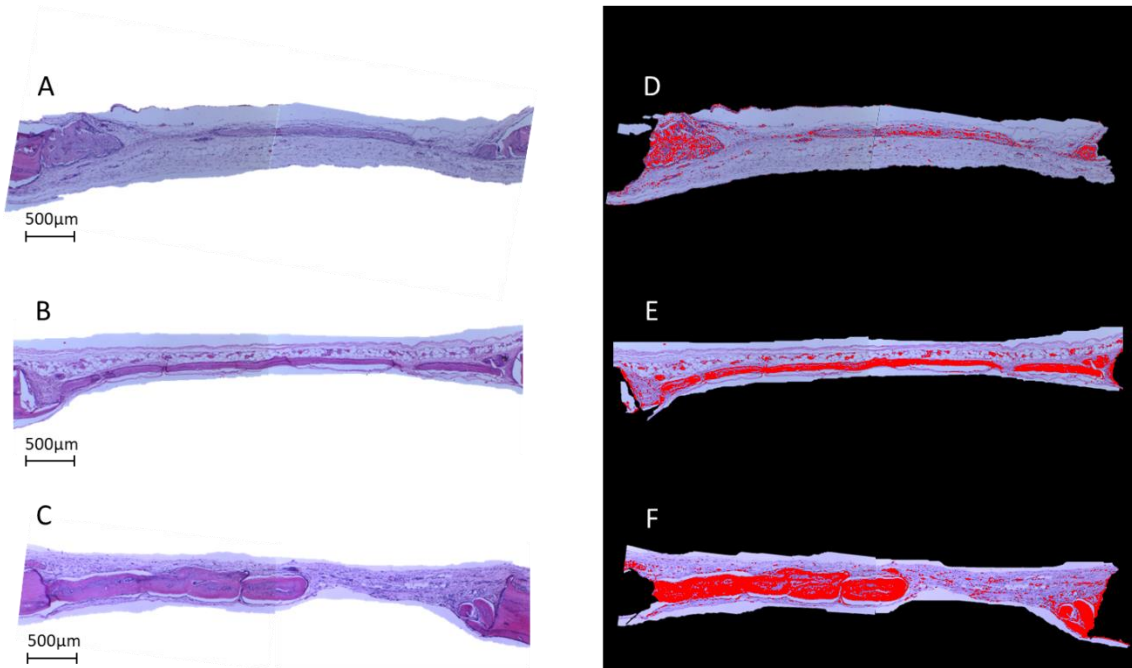


Figura 7: (A, B, C) Fotomicrografias das lâminas em HE com aumento de 10X e visão panorâmica da região de maior diâmetro (5 mm) das cavidades ósseas preenchidas por coágulo e acompanhamento de 15 dias nos grupos: Controle (A), L4 (B) e L7 (C). (D, E, F) Imagens delimitadas no *software Image J* representando comparativamente em vermelho as áreas de tecido ósseo mineralizado formado nos grupos Controle (D), L4 (E) e L7 (F).

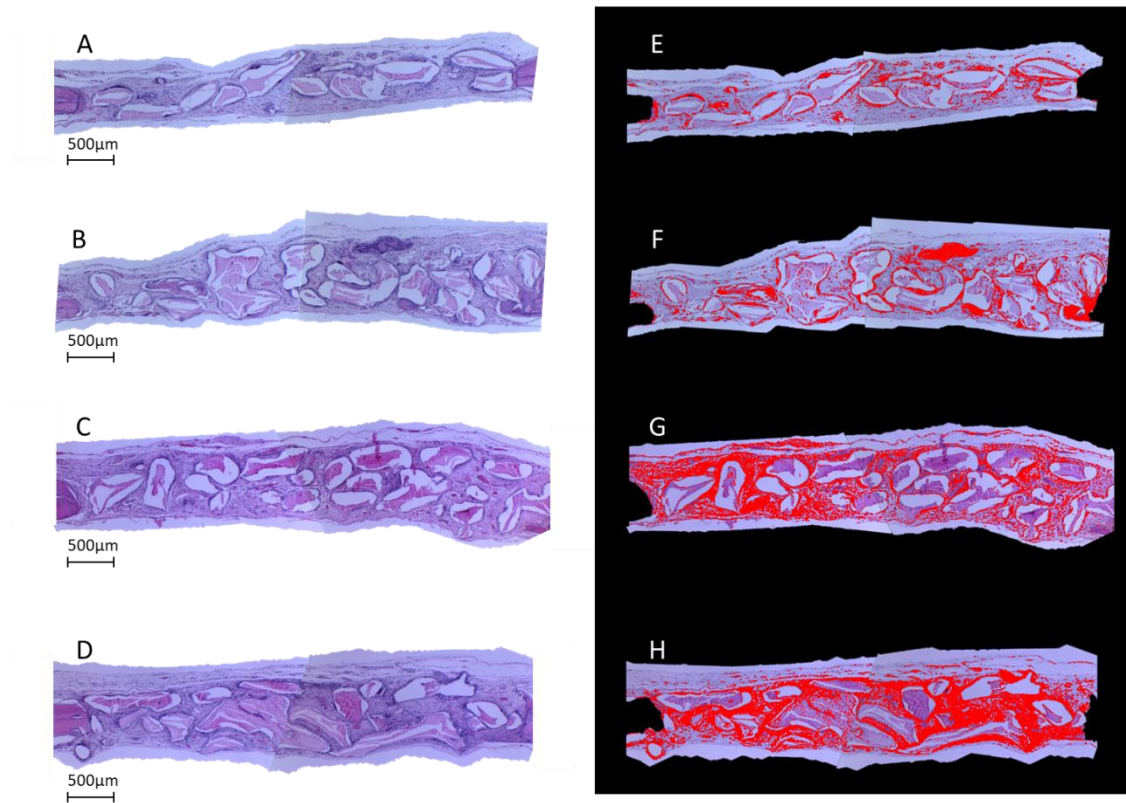


Figura 8: (A, B, C) Fotomicrografias das lâminas em HE com aumento de 10X e visão panorâmica da região de maior diâmetro (5 mm) das cavidades ósseas preenchidas com OBI e acompanhamento de 30 dias nos grupos: Controle (A), L4 (B), L7 (C), L11 (D). (E, F, J, H) Imagens delimitadas no *software Image J* representando comparativamente em vermelho as áreas de tecido ósseo mineralizado formado nos grupos controle (E), L4 (F), L7 (G) e L11 (H).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os grupos tratados pela TLBP mostraram maior atividade osteoblástica com maior deposição de matriz óssea em comparação aos grupos controle tanto nas cavidades preenchidas com coágulo como nas preenchidas com osso bovino inorgânico;

Na análise histológica qualitativa, os grupos tratados, independentemente do número de sessões, se comportaram de maneira semelhante, se destacando, em comparação aos grupos controle, por maior deposição e mineralização de matriz mineralizada em ambos os tempos observacionais;

A variação no número de sessões de TLBP interfere sobre quantidade de tecido ósseo mineralizado neoformado em grupos experimentais em comparação ao grupo controle. Um número mínimo de sete sessões foi fundamental para a obtenção do benefício nas cavidades preenchidas com coágulo aos 15 dias e osso bovino inorgânico aos 30 dias, somado a isso o aumento na quantidade de sessões (L11) não causou melhores resultados sobre o coágulo ou osso bovino inorgânico;

A análise dos parâmetros microtomográficos não mostrou diferenças nos parâmetros ósseos avaliados.

REFERÊNCIAS GERAIS¹

ACAR, Ahmet Hüseyin et al. Bone regeneration by low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound therapy in the rabbit calvarium. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 61, p. 60–65, 2016.

AZEVEDO, LH et al. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth. **Lasers in Medical Science**, Londres, n. 2, v. 21, p. 86–89, 2006.

BARBOSA, Danillo et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on bone repair in rats: Optical densitometry analysis. **Lasers in Medical Science**, Londres n. 2, v. 28, p. 651–656, 2013.

BOSCO, Alvaro Francisco et al. Effects of low-level laser therapy on bone healing of critical-size defects treated with bovine bone graft. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 163, p. 303–310, 2016.

BRASSOLATTI, Patricia et al. Photobiomodulation on critical bone defects of rat calvaria : a systematic review. **Lasers in Medical Science**, Londres, v. 33, p. 1841–1848, 2018.

CHUNG, Hoon et al. The nuts and bolts of low-level laser (Light) therapy. **Annals of Biomedical Engineering**, Nova York, n. 2, v. 40, p. 516–533, 2012.

DE OLIVEIRA, Guilherme J.P.L. et al. Effect of low-level laser therapy on the healing of sites grafted with coagulum, deproteinized bovine bone, and biphasic ceramic made of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate. In vivo study in rats. **Lasers in Surgery and Medicine**, Nova York, n. 6, v. 50, p. 651–660, 2018.

DIEZ, G F et al. Tomographic follow-up of bone regeneration after bone block harvesting from the mandibular ramus. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Nova York, n. 3, v. 43, p. 335–340, 2014.

¹ Este trabalho seguiu as normas de formatação da ABNT (NBR 6027, NBR 6024, NBR 14724, NBR, 10520).

GARCEZ, AS, RIBEIRO MS, Núñez SC. **Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2012. p. 14–26.

HANKENSON, K. D.; GAGNE, K.; SHAUGHNESSY, M. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 94, p. 3–12, 2015.

HUANG, Ying Ying et al. Biphasic dose response in low level lighththerapy. **Dose-Response**, Amherst, n. 4, v. 7, p. 358–383, 2009.

HUANG, Ying Ying et al. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. **Dose-Response**, Amherst, n. 4, v. 9, p. 602–618, 2011.

KASUYA, Shin et al. New Bone Formation Process Using Bio-Oss and Collagen Membrane for Rat Calvarial Bone Defect. **Implant Dentistry**, Baltimore, n. 2, v. 27, p. 158–164, 2018.

KUNIMATSU, Ryo et al. Effects of high-frequency near-infrared diode laser irradiation on the proliferation and migration of mouse calvarial osteoblasts. **Lasers in Medical Science**, Londres, n. 5, v. 33, p. 959–966, 2018.

MARQUES, Leonardo et al. New LLLT protocol to speed up the bone healing process—histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. **Lasers in Medical Science**, Londres, n. 4, v. 30, p. 1225–1230, 2015.

MOREIRA, Guilherme Santos et al. Effect of Low-Level Laser on the Healing of Bone Defects Filled with Autogenous Bone or Bioactive Glass: In Vivo Study. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, Lombard, n. 1, v. 33, p. 169–174, 2018.

OBEROI, Sapna et al. Effect of prophylactic low level laser therapy on oral mucositis: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, Lausanne, n. 9, v. 9, 2014.

OLIVEIRA, Aline Muniz De et al. Effectiveness and acceleration of bone repair in critical-sized rat calvarial defects using low-level laser therapy. **Lasers in Surgery and Medicine**, Londres, n. 1, v. 46, p. 61–67, 2014.

PIATTELLI M, GIAN DDS, FAVERO A, SCARANO A, ORSINI DDSG, Piattelli DDSA. Bone Reactions to Anorganic Bovine Bone (Bio-Oss) Used in Sinus Augmentation Procedures : A Histologic Long-Term Report of 20 Cases in Humans. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, n. 6, v. 14, p. 835–840, 1999.

SANTINONI, Carolina dos Santos et al. Influence of low-level laser therapy on the healing of human bone maxillofacial defects: A systematic review. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 169, p. 83–89, 2017.

TARRIDE, Jean Eric et al. Loss of health related quality of life following low-trauma fractures in the elderly. **BMC Geriatrics**, Londres, n. 1, v. 16, p. 1–11, 2016.

TRAINI T, DEGIDI M, SAMMONS R, STANLEY P, Piattelli A. Histologic and Elemental Microanalytical Substitution Following Sinus Floor Augmentation in Humans. **J Periodontol**, Indianapolis v. 79, n. 7, p. 1232–1240, 2008.

VAJGEL, André et al. A systematic review on the critical size defect model. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, n. 8, v. 25, p. 879–893, 2014.

WU, J.; LI, B.; LIN, X. Histological outcomes of sinus augmentation for dental implants with calcium phosphate or deproteinized bovine bone: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, n. 11, v. 45, p. 1471–1477, 2016.

XU, Lianyi et al. Reosseointegration Following Regenerative Therapy of Tissue-Engineered Bone in a Canine Model of Experimental Peri-Implantitis. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, Hamilton, n. 2, v. 18, p. 379–391, 2016.

ZEIN, Randa; SELTING, Wayne; BENEDICENTI, Stefano. Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Regeneration During Osseointegration and Bone Graft. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, n. 12, v. 35, p. 649–658, 2017.

ZIZZARI, Vincenzo Luca et al. Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, St. Louis, n. 4, v.122, p. 392-402, 2016.

APÊNDICE A - Dados numéricos da análise histomorfométrica

Tabela 1. Percentagem de tecido ósseo mineralizado em relação à área tecidual total aos 15 dias de observação nas cavidades preenchidas com coágulo.

Subgrupo	M (%)	Dp	Ep	Ic
C ₁₅	26.97	8.084970	3.300675	8.484656
L4 ₁₅	39.67	12.568070	5.130893	13.189381
L7 ₁₅	49.75*	5.992802	2.446551	6.289060

Os valores expressos como a média da percentagem da área mineralizada. * $p < 0,05$ vs. controle. Média (M), desvio padrão (Dp), erro padrão (Ep), intervalo de confiança (Ic).

Tabela 2. Percentagem de tecido ósseo mineralizado em relação à área tecidual total aos 30 dias de observação nas cavidades preenchidas com coágulo.

Subgrupo	M (%)	Dp	Ep	Ic
C ₃₀	58.66	4.816192	1.966202	5.054283
L4 ₃₀	59.84	12.168532	4.967782	12.770091
L7 ₃₀	65.70	10.227656	4.175423	10.733267
L11 ₃₀	57.84	5.421096	2.213153	5.689091

Os valores expressos como a média da percentagem da área mineralizada. Média (M), desvio padrão (Dp), erro padrão (Ep), intervalo de confiança (Ic).

Tabela 3. Percentagem tecido ósseo mineralizado em relação à área tecidual total aos 15 dias de observação nas cavidades preenchidas com OBI.

Subgrupo	M (%)	Dp	Ep	Ic
C ₁₅	22.30	2.673643	1.0915100	2.805816
L4 ₁₅	30.55*	3.919803	1.6002528	4.113581
L7 ₁₅	35.13*	2.251967	0.9193615	2.363294

Os valores expressos como a média da percentagem da área mineralizada. * $p < 0,05$ vs. controle. Média (M), desvio padrão (Dp), erro padrão (Ep), intervalo de confiança (Ic).

Tabela 4. Percentagem de tecido ósseo mineralizado em relação à área tecidual total aos 30 dias de observação nas cavidades preenchidas com OBI.

Subgrupo	M (%)	Dp	Ep	Ic
C ₃₀	37.39	6.416062	2.6193463	6.733244
L4 ₃₀	46.75	6.656655	2.7175682	6.985731
L7 ₃₀	51.94*	6.621355	2.7031567	6.948686
L11 ₃₀	52.20*	5.284495	2.1573862	5.545738

Os valores expressos como a média da percentagem da área mineralizada. * $p < 0,05$ vs. controle. Média (M), desvio padrão (Dp), erro padrão (Ep), intervalo de confiança (Ic).

ANEXO A - Aprovação na Comissão de Ética no uso de animais

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 010/2014, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **"Uso de alendronato de sódio e da laserterapia associados ao Bio-OSS no reparo de defeitos ósseos críticos. Estudo histomorfométrico e microtomográfico em calvária de ratos."** que tem como responsável o (a) docente **Daniela Nascimento Silva**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 06/06/14.



Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFES

Vitória (ES), 06 de junho de 2014.

ANEXO B- Normas da Revista “*Archives of Oral Biology*”

ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

A Multidisciplinary Journal of Oral & Craniofacial Sciences

AUTHOR INFORMATION PACK

DESCRIPTION

Archives of Oral Biology operates a web-based submission and review system. Please register at <http://ees.elsevier.com/aob> to submit a paper. *Archives of Oral Biology* is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality in the **oral** and **craniofacial** sciences. The journal is particularly interested in research which advances knowledge in the mechanisms of **craniofacial development** and **disease**, including: **Cell** and **molecular biology** **Molecular genetics** **Immunology** **Pathogenesis** **Cellular microbiology** **Embryology** **Syndromology** **Forensic dentistry** The aim is to be inclusive and multidisciplinary and papers are also welcome in the fields of structure and function of craniofacial tissues over the whole range of vertebrates including studies concerned with palaeontology and comparative anatomy. *Archives of Oral Biology* will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

AUDIENCE

Oral biologists, physiologists, anatomists, pathologists.

IMPACT FACTOR

2017: 2.050 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief:

G.B. Proctor, Salivary Research Unit, Dental Institute, King's College London, Floor 17 Guy's Tower, London, SE1 9RT, UK

S.W. Cadden, University of Dundee, Dundee, UK

Associate Editors:

F. Lundy, Queen's University, Belfast

D. Grenier, Laval University, Quebec City, Canada

G. N. Belibasakis, Karolinska Institute, Sweden

T. Wright, University of North Carolina, Chapel Hill, USA

Editorial Board:

V. Arana-Chavez, São Paulo, Brazil

Z. Bian, Hubei, China

M.R. Byers, Seattle, USA

G.H. Carpenter, London, UK

P.M. Castelo, São Paulo, Brazil

J-h Chen, Xi'an, China

K. Cogo-Müller, São Paulo, Brazil

C. Dawes, Manitoba, Canada

X. Duan, Xi'an, Shaanxi

M.B.D. Gaviao, São Paulo, Brazil

S. Herring, Seattle, USA

Y. Jin, Xi'an, China
C.P. McArthur, Kansas City, USA
L. Mei, Hong Kong, China
G. Murray, University of Sydney, Sydney, Australia
J.Y. Ro, Maryland, USA
C. Robinson, Leeds, UK
L.P. Samaranayake, Queensland, Australia
B.J. Sessle, Toronto, Canada
P.T. Sharpe, London, UK
A.J. Smith, Birmingham, UK
P. Stashenko, Boston, USA
D. Steinberg, Jerusalem, Israel
H. Suda, Tokyo, Japan
K. Tanne, Hiroshima, Japan
H.W. van der Glas, Utrecht, The Netherlands
L.J. Walsh, Brisbane, Australia
M. Wang, Xi'an, China
T. Zelles, Budapest, Hungary

GUIDE FOR AUTHORS

Editors-in-Chief:

Professor G B Proctor, London, UK

Professor S W Cadden, Dundee, Scotland

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific

quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- salivary biology
- mastication and swallowing
- comparative anatomy
- paeleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will consider clinical papers only where they make a significant contribution to the understanding of a disease process. These guidelines generally follow the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals

Types of Contribution

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. Editorial commentaries will also be considered but only by invitation. All submissions will be refereed. *Page charges* This journal has no page charges.

Submission checklist

You should use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check all relevant sections in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts (where applicable)

Highlights (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Declarations of authors' contributions have been made if there are four or more authors
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center

BEFORE YOU BEGIN***Ethics in publishing***

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms sex and gender should be used correctly. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed. All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically, without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article is likely to be checked by the originality detection service CrossCheck. *Preprints* Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Contributors

If there are four or more authors, then each is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that "All authors have read and approved the final article" should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases. For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online. After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peerreviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution. Regardless of how you choose to publish your article, the

journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards. For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more. This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In

particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To minimize unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscript Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work. Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is occasionally appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration.

Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes. As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition are: ADP, AMP, ATP, DEAEcellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris. Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page as well as being defined in both the abstract and the main text on first usage. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations

other than the above should not be used in titles and even these should be avoided if possible.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.) but who did not meet all the criteria for authorship (see Authorship section above).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa]. It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the Int J Syst Bacteriol since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. '*salmonellae*'; plurals may be anglicized e.g. '*salmonellas*'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus'

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.

- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Illustration services

Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from

these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Reference style Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered online or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication. *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article.

Journal of Scientific Communications, 163, 51–59.
<https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article. *Heliyon*, 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13 March 2003.

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a conference paper or poster presentation:

Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described. There are different ways to link your datasets to your article.

When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page . For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-

prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.: -

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
- Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.
- Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")
- n values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply $n=50$ when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).
- Stating that $P=0.000$ (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is $P<0.0005$.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.