

Efeito da laserterapia na osteogênese em defeitos de calota craniana preenchidos com cimento de α -TCP e grânulos de β -TCP/HA: modelo animal

Effect of laser therapy on osteogenesis in skullcap defects filled with α -TCP cement and β -TCP/HA granules: animal model

Efecto de la terapia con láser sobre la osteogénesis en defectos de la escutelaría rellenos con cemento α -TCP y gránulos β -TCP/HA: modelo animal

Recebido: 05/10/2020 | Revisado: 09/10/2020 | Aceito: 13/10/2020 | Publicado: 14/10/2020

André Luiz Marinho Falcão Gondim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3581-419X>

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil

E-mail: algondim@yahoo.com.br

Gustavo Augusto Seabra Barbosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0552-4933>

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil

E-mail: gustavoaseabra@hotmail.com

Wagner Ranier Maciel Dantas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4904-187X>

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil

E-mail: wagnerranier@yahoo.com.br

Euler Maciel Dantas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1579-8997>

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil

E-mail: eulerdantas@yahoo.com.br

Henrique Telles Ramos de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0500-8592>

Fundação para Reabilitação de Deformidades Cranio-Faciais, Brasil

E-mail: htoliveira@ibest.com.br

Luis Ferreira de Almeida Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3141-1227>

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil

E-mail: luisneto_w@hotmail.com

Karolina Pires Marcelino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2301-5155>

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil

E-mail: karolpiresm@gmail.com

Rogério Miranda Pagnoncelli

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8621-3696>

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: rpagnoncelli@pucrs.br

Resumo

A irradiação com laser de baixa intensidade (LLLI) modula diversos processos biológicos como a proliferação e diferenciação das células, estimulando a cicatrização dos tecidos. Objetivou-se avaliar, através de uma análise histomorfométrica, o processo de osteogênese em defeitos confeccionados no crânio de ratos preenchidos com biomateriais e submetidos à radiação laser infravermelha (GaAIAs). Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, cujo peso variou entre 250gr e 300gr, distribuídos aleatoriamente em 2 grupos, Grupo Teste (GT) e Grupo Controle (GC). Ambos os grupos tiveram 3 tempos de observação, 7, 14 e 21 dias, formando 6 subgrupos. Dois defeitos de 4mm de diâmetro foram confeccionados nos ossos parietais e uma das cavidades foi enxertada com o biomaterial α -TCP e a outra com o β -TCP/HA. Os grupos de teste receberam terapia com laser de baixa intensidade (LLLI), em espectro infravermelho ($\lambda = 830\text{nm}$, 2 J/cm^2 , 90mW , 27s). Nos grupos controle foi feito todo o protocolo cirúrgico, porém sem aplicação do laser. O protocolo da laserterapia foi estabelecido a cada 48 horas, tendo início imediatamente após a cirurgia seguindo nos intervalos até o sexto dia de pós-operatório. Os animais foram sacrificados no 7º, 14º e 21º dias. A análise histomorfométrica mostrou que há biomodulação óssea positiva evidenciada nos grupos teste, com resultado significativo em 21 dias. O grupo teste com o β -TCP/HA, apresentou maior área de trabéculas ósseas do que os grupos controle. Pode-se concluir que a laserterapia, no protocolo estabelecido, atua como biomodulador ósseo, estimulando a osteogênese nas áreas enxertadas, podendo ser utilizada como adjuvante no processo de reparo ósseo.

Palavras-chave: Terapia a laser; Terapia com luz de baixa intensidade; Osteogênese; Ratos; Materiais biocompatíveis.

Abstract

Low-level laser irradiation (LLLI) modulates several biological processes such as cell proliferation and differentiation, stimulating tissue healing. The objective was to evaluate, through a histomorphometric analysis, the osteogenesis process in defects made in the skull of rats filled with biomaterials and submitted to infrared laser radiation (GaAIAs). Thirty male Wistar rats were used, whose weight varied between 250gr and 300gr, randomly distributed in 2 groups, Test Group (GT) and Control Group (CG). Both groups had 3 observation times, 7, 14 and 21 days, forming 6 subgroups. Two 4mm diameter defects were made in the parietal bones and one of the cavities was grafted with the biomaterial α -TCP and the other with β -TCP / HA. The test groups received low-level laser therapy (LLLI), in infrared spectrum ($\lambda = 830\text{nm}$, 2 J/cm^2 , 90mW , 27s). In the control groups, the entire surgical protocol was performed, but without laser application. The laser therapy protocol was established every 48 hours, starting immediately after the surgery and continuing in intervals until the sixth postoperative day. The animals were sacrificed on the 7th, 14th and 21st days. Histomorphometric analysis showed that there is positive bone biomodulation evidenced in the test groups, with a significant result in 21 days. The test group with β -TCP / HA, showed a larger area of bone trabeculae than the control groups. It can be concluded that laser therapy, in the established protocol, acts as a bone biomodulator, stimulating osteogenesis in the grafted areas, and can be used as an adjuvant in the bone repair process.

Keywords: Laser therapy; Low-level light therapy; Osteogenesis; Rats; Biocompatible materials.

Resumen

La irradiación láser de bajo nivel (LLLI) modula varios procesos biológicos como la proliferación y diferenciación celular, estimulando la cicatrización de los tejidos. El objetivo fue evaluar, mediante un análisis histomorfométrico, el proceso de osteogénesis en defectos realizados en el cráneo de ratas rellenas de biomateriales y sometidas a radiación láser infrarroja (GaAIAs). Se utilizaron treinta ratas Wistar macho, cuyo peso varió entre 250gr y 300gr, distribuidas aleatoriamente en 2 grupos, Test Group (GT) y Control Group (CG). Ambos grupos tuvieron 3 tiempos de observación, 7, 14 y 21 días, formando 6 subgrupos. Se realizaron dos defectos de 4 mm de diámetro en los huesos parietales y una de las cavidades se injertó con el biomaterial α -TCP y la otra con β -TCP / HA. Los grupos de prueba recibieron terapia con láser de bajo nivel (LLLI), en espectro infrarrojo ($\lambda = 830\text{nm}$, 2 J/cm^2 , 90mW , 27s). En los grupos de control se realizó todo el protocolo quirúrgico, pero sin

aplicación de láser. El protocolo de la terapia láser se estableció cada 48 horas, comenzando inmediatamente después de la cirugía y continuando en intervalos hasta el sexto día postoperatorio. Los animales se sacrificaron los días 7, 14 y 21. El análisis histomorfométrico mostró que hay biomodulación ósea positiva evidenciada en los grupos de prueba, con un resultado significativo a los 21 días. El grupo de prueba con β -TCP / HA mostró un área más grande de trabéculas óseas que los grupos de control. Se puede concluir que la terapia con láser, en el protocolo establecido, actúa como biomodulador óseo, estimulando la osteogénesis en las áreas injertadas, pudiendo utilizarse como coadyuvante en el proceso de reparación ósea.

Palabras clave: Terapia por láser; Terapia por luz de baja intensidad; Osteogénesis; Ratas; Materiales biocompatibles.

1. Introdução

A perda óssea é considerada um problema para as reabilitações odontológicas e relaciona-se à exposição do tecido ósseo a várias condições patológicas adversas. Entretanto, o tecido ósseo possui um potencial de regeneração que é sujeito a certas condições intrínsecas e extrínsecas ao organismo. Os aspectos que estimulam ou dificultam a reparação óssea são, entre outros: falhas de vascularização, instabilidade mecânica e tecidos competidores com alta atividade de proliferação. A perda de segmentos ósseos proporcionam defeitos, geralmente, muito extensos para serem regenerados de forma espontânea e promoverem desta forma o reparo ósseo (Roberts & Garetto, 2000; Pinheiro & Gerbi, 2006; Bosco et al., 2016; Diker, Aytac, Helvacioğlu, Dagdelen & Oguz, 2019; Pouremadi et al., 2019).

Os procedimentos cirúrgicos nos ossos ocasionam uma diminuição de estrutura calcificada, o que leva ao afastamento das bordas dos tecidos traumatizados, osteotomizados e/ou ostectomizados, induzindo a uma cicatrização por segunda intenção. A redução de estrutura óssea por fraturas faciais com perda de substância ou processos patológicos dentro do complexo estomatognático, tais como osteomielites, lesões císticas, tumores odontogênicos e defeitos ósseos periodontais, somado a necessidade contínua e crescente de promover a osseointegração de implantes e enxertos ósseos nos sítios receptores e doadores, têm incentivado a busca por novas tecnologias que visem auxiliar a reparação do tecido ósseo ou acelerar o processo de cicatrização óssea (Hupp & Tucker, 2003; Pinheiro & Gerbi, 2006; Bosco et al., 2016; Diker et al., 2019; Pouremadi et al., 2019).

A irradiação com laser de baixa intensidade (LLLI) surgiu como uma terapia adjuvante para estimular a reparação de diferentes tecidos biológicos em diversos tipos de tratamentos odontológicos. Estudos experimentais tanto *in vitro* e como *in vivo*, mostram que o LLLI modula diversos processos biológicos como a proliferação, diferenciação e calcificação dos osteoblastos, estimulando a cicatrização dos tecidos, através da promoção da proliferação celular e a formação dos tecidos de granulação (Mulliken & Glowacki, 1980; Nasr, Aichelmann-Reidy & Yukna, 1999; Li, Weng & Tam, 2007; Diker et al., 2019). Entretanto, esse potencial do LLLI só ocorre em uma janela terapêutica específica. A proliferação celular e a síntese de DNA são estimuladas apenas quando as células estão em crescimento ativo. Em estudos *in vivo*, a irradiação a laser aumenta a deposição óssea e acelera a regeneração óssea nos estágios iniciais do reparo ósseo (Shiratori et al., 2005; Pinheiro & Gerbi, 2006; Zein, Selting & Benedicenti, 2017)

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar histomorfometricamente o efeito bioestimulatório do LLLI associado ao cimento de α -tcp e grânulos de β -tcp/ha na osteogênese após defeitos induzidos cirurgicamente na calota craniana de ratos.

2. Metodologia

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa para uso de animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (protocolo CEUA 09/00084).

A amostra foi composta por 30 ratos machos (Wistar), pesando entre 250 e 300g, com 120 dias de vida, mantidos no laboratório da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Eles foram mantidos em ciclo claro e escuro (12/12 horas) e temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e receberam dieta e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos em 2 grupos: Grupo Teste (GT) e Grupo Controle (GC). Ambos os grupos tiveram 3 tempos de observação, 7, 14 e 21 dias, formando 6 subgrupos.

Após pesagem na balança de precisão, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (ketamina®) 50mg/kg e cloridrato de xilazina (calmiun®) 5 mg/kg, por via intraperitoneal, para permanecerem anestesiados durante todo o procedimento cirúrgico. Os ratos tiveram o pelo cortado no topo da cabeça na região entre as orelhas.

A cirurgia está ilustrada na Figura 1, foi iniciada por incisão dermoperiosteal linear coronal entre as orelhas medindo 1,5 cm de comprimento, em seguida foi realizado o descolamento do periosteio com o descolador de Molt, expondo a cortical externa do crânio. Foram marcadas previamente com auxílio de uma sonda exploratória as regiões de confecção

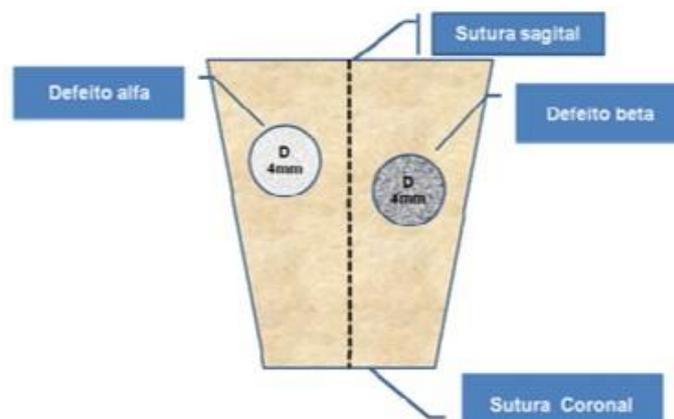
dos defeitos, preservando a sutura sagital mediana. As duas osteotomias foram distribuídas lateralmente à sutura sagital mediana como mostrado na Figura 2, com distância de 4 mm uma da outra, medida com um medidor de espessura de precisão, nos ossos parietais. Os defeitos foram realizados com auxílio de brocas cilíndricas 4mm de diâmetro em baixa sob irrigação abundante com solução salina. Após a confecção dos defeitos, foi realizada a inserção do cimento de α -fosfato tricálcico (α -TCP10 – Labiomat, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS) na cavidade esquerda e na cavidade direita os grânulos de β -fosfato tricálcico/HA (de β -TCP/HA Osteosynt® – EINCO Biomaterial Ltda2, Belo Horizonte/MG).

Figura 1 – Imagens do transcirúrgico. A: incisão coronal; B: um dos defeitos criados, mostrando o tamanho padronizado de 4mm; C: inserção do cimento de α -fosfato tricálcico na cavidade esquerda e na cavidade direita os grânulos de β -fosfato tricálcico/HA.



Fonte: Autores (2020).

Figura 2 – Esquema de crânio do rato com os defeitos parietais bilaterais criados.



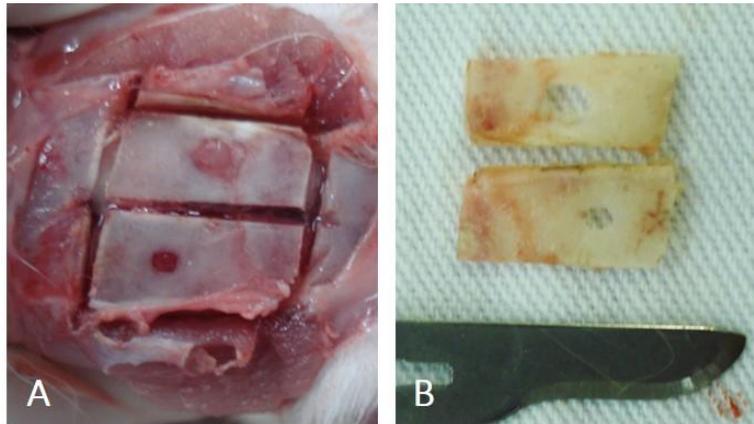
Fonte: Autores (2020).

Os tecidos moles da cabeça foram suturados com fio de náilon 4.0, com pontos simples interrompidos. A limpeza da área foi realizada com gaze embebida em soro fisiológico, para retirada dos resíduos de sangue coagulado, e os animais foram colocados em decúbito ventral nas respectivas gaiolas para recuperação da anestesia. Todos os animais receberam uma dose única de penicilina G benzatina (20.000 unidades/kg) por via intramuscular, imediatamente após a cirurgia e paracetamol analgésico (50 mg/kg) por via intraperitoneal nos 3 primeiros dias após a cirurgia.

O equipamento utilizado para aplicação da laserterapia foi o laser Arseneto Alumínio Gálio (GaAlAs) TheraLaser® (DMC equipamento LTDA), utilizando um comprimento de onda no espectro infravermelho, com: 830nm, 90mw, com 2 J/cm². O laser foi aplicado duas vezes, ou seja, duas aplicações por sessão, individualmente em cada defeito criado desde o pós-operatório imediato e em 2, 4, 6, dias após a cirurgia. A aplicação do laser foi realizada em ambos os lados da cabeça do rato, nas regiões correspondendo aos defeitos realizados. O grupo teste (GT) como também o grupo controle (GC) foram cada um divididos em 3 grupos, nos quais os ratos foram separados pelo tempo de avaliação GT7 - 07 dias; GT14 - 14 dias; GT21 - 21 dias e GC7 - 7 dias; 14 - 14 dias; GC21 - 21 dias.

Após o pós-operatório de cada grupo (GT7 - 07 dias; GT14 - 14 dias; GT21 - 21 dias; GC7 - 7 dias; GC14 - 14 dias; GC21 - 21 dias), os animais foram eutanasiados por inalação contínua de isoflurano. A retirada da peça está ilustrada na Figura 3, foi realizada a osteotomia dos ossos do crânio com broca tronco-cônica 702, em baixa rotação, sob irrigação constante com solução salina a uma distância de pelo menos quatro milímetros da cavidade. Após esse procedimento, a osteotomia foi finalizada com cinzel reto, para minimizar possíveis danos no osso, gerados pelo atrito com a broca.

Figura 3 – Segunda abordagem para remoção das peças. A: ossos do crânio osteotomizados; B: peças removidas.

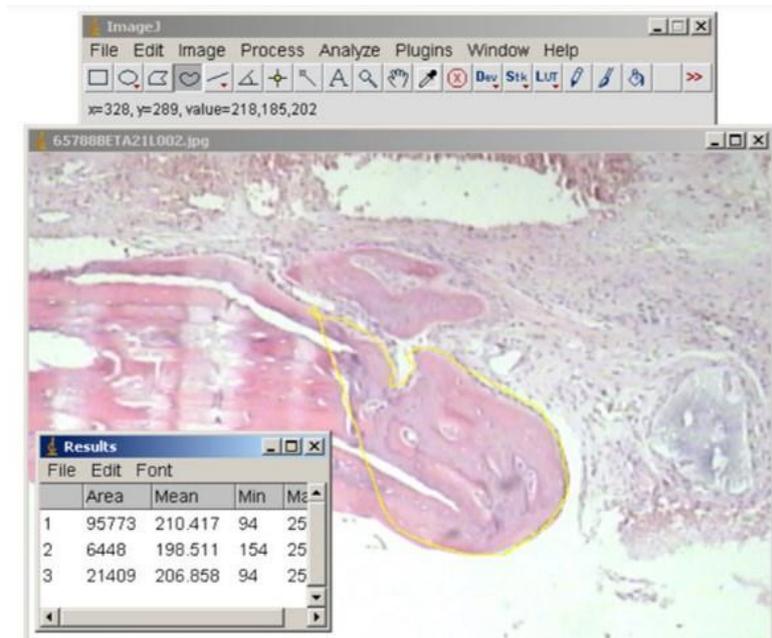


Fonte: Autores (2020).

Os espécimes foram acondicionados em recipientes previamente etiquetados, contendo solução de formol a 10% e encaminhados ao Laboratório de Patologia do Instituto de Patologia (IPAT) localizado na Avenida Carlos Gomes, 1973, Porto Alegre (Anexo B). Para calibração um único examinador avaliou 20 lâminas, supervisionado por um patologista experiente, repetiu a avaliação de cada lâmina, depois as medidas obtidas nas duas observações foram comparadas e aplicado o teste intraexaminador Kappa para verificar a acurácia das medidas.

O estudo das lâminas foi realizado com o uso da microscopia óptica, visando avaliar o processo de reparo ósseo. Para isso, utilizou-se um aumento microscópico de 40X. O estudo microscópico teve como objetivo medir a quantidade de trabéculas ósseas neoformadas. Para isso, as lâminas obtidas de cada animal foram submetidas ao exame microscópico pelo sistema computacional de captura e análise de imagens – *Image J* (versão 1.41), sob um foco fixo e clareza de campo, a imagem do microscópio foi capturada por uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio e transmitida para a tela do computador, onde a imagem foi digitalizada como ilustrado na Figura 4.

Figura 4 – Método de leitura da lâmina, área de osso neoformado. *Software Image J*, versão 1.41.



Fonte: Autores (2020).

Após a captura das imagens em um total de 60 cortes histológicos correspondentes a todos os grupos de estudo (controle e teste), foram mensurados definindo o contorno das regiões desejadas, utilizando o cursor do mouse, avaliando, assim, o processo de evolução do reparo ósseo, por meio da mensuração das áreas de neoformação óssea na área total do defeito.

Os valores obtidos para cada trabécula neoformada óssea foram transferidos para o Microsoft Excel for Windows, incluídos na tabela definitiva e submetidos à análise estatística por meio do programa SPSS versão 10.0 for Windows. Para comparação entre os grupos laser e controle (2 grupos) foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney; para comparação entre os tempos de 7, 14 e 21 dias (3 períodos de tempo) foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os resultados foram considerados significativos a um nível máximo de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Para processamento e análise desses dados foi utilizado o software estatístico SPSS versão 10.0.

3. Resultados

A Tabela 1 resume os dados observados. Através dos resultados do teste não paramétrico de Mann-Whitney, não houve diferença significativa entre os grupos nos tempos

de 7, 14 e 21 (Defeito α -TCP) dias, entretanto, há diferença significativa entre os grupos Laser e Controle apenas na comparação de 21 dias - Defeito β - TCP/HA. Por esta comparação verifica-se que a porcentagem média de neoformação óssea é significativamente maior para o grupo laser ($p = 0,016$).

Tabela 1 – Comparação da porcentagem e neoformação óssea entre os grupos controle e teste para cada tipo de defeito em cada período. DP= desvio padrão.

<i>Tempo</i>	<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>p</i>
7 dias	Defeito α-TCP				
	Laser	5	2,57	2,80	0,421
	Controle	5	1,06	2,37	
	Defeito β -TCP/HA				
	Laser	5	3,07	2,14	0,421
	Controle	5	1,94	3,10	
14 dias	Defeito α-TCP				
	Laser	5	8,26	6,54	0,548
	Controle	5	6,48	5,00	
	Defeito β -TCP/HA				
	Laser	5	10,79	4,69	0,690
	Controle	5	8,11	5,80	
21 dias	Defeito α-TCP				
	Laser	5	22,54	8,62	0,421
	Controle	5	17,54	5,58	
	Defeito β -TCP/HA				
	Laser	5	15,09	9,11	0,016*
	Controle	5	2,53	1,19	

Fonte: Autores (2020).

4. Discussão

Diversos biomateriais são constantemente estudados para substituir o tecido ósseo e fornecer uma alternativa viável ao enxerto autógeno, que, apesar de ser o melhor substituto ósseo, apresenta desvantagens, principalmente quanto à morbidade e a quantidade de enxerto disponível. As biocerâmicas de fosfato de cálcio ainda estão sendo pesquisadas e, cada vez mais, são usados em procedimentos de reconstrução de tecidos. Existem diversos tipos de fosfato de cálcio oferecidos para uso em Odontologia, Medicina e Medicina Veterinária, onde

suas características e propriedades físico-químicas induzem uma resposta biológica única e, portanto, requerem indicação e aplicação específicas (Kurashina et al., 1995; Ohura et al., 1996).

A análise histomorfométrica utilizada permitiu detectar a presença óssea no defeito e quantificar o tamanho da área de neoformação. A importância de tal análise é confirmada nos estudos de Eski, Cil, Ayhan, Ilgan & Sengezer (2005), Marzouk, Gamal, Al-Awady & Sharawy (2007) e Zein et al. (2017) que relataram ser essencial a análise quantitativa para estudos que visem avaliar a eficácia de novas modalidades terapêuticas na osteogênese.

O advento do laser traz inúmeros benefícios para a humanidade. Porém, por se tratar de um avanço tecnológico recente, os padrões de aplicação no tecido ósseo requerem extensa pesquisa nesta área, com o objetivo de estabelecer parâmetros de uso que contribuam para a eficácia do laser como fator biomodulador (Bosco et al., 2016). A enorme variação dos parâmetros utilizados na LLLT no processo de cicatrização tem dificultado a adequada interpretação dos seus efeitos, bem como a diversidade de modelos utilizados. Isso porque a escolha dos parâmetros para definir os protocolos de uso do laser é feita de acordo com a experiência dos autores, uma vez que não existem parâmetros universalmente aceitos.

Nesta pesquisa, foi utilizado o laser infravermelho de GaAlAs ($\lambda = 830\text{nm}$) devido à maior penetração tecidual, principalmente no tecido subcutâneo. Os procedimentos de radiação realizados neste estudo utilizaram a dose efetiva de 4 J/cm^2 por sessão, de acordo com o protocolo clínico estabelecido pela linha de pesquisa em Odontologia a Laser da PUCRS, corroborando com as recomendações de Khadra, Lyngstadaas, Haanæs & Mustafa (2005) e Pinheiro et al. (2006).

Este estudo demonstrou numericamente um reparo ósseo mais avançado nos grupos irradiados quando comparado ao controle, com maior formação óssea e uma quantidade de fibras colágenas ao redor do enxerto de α -TCP e β -TCP/HA dentro do defeito criado, a partir de 7 dias de pós-operatório, considerando a capacidade de osteocondução do enxerto. Esse fenômeno sugere que a frequência de aplicação da terapia a laser, a cada 48 horas, pode ser eficaz quando aplicada durante a fase de proliferação celular, corroborando os estudos de Pinheiro & Gerbi (2006), Weber, Pinheiro, Oliveira, Oliveira & Ramalho (2006), Zein et al. (2017) e Pouremadi et al. (2019).

A relação entre laserterapia e enxertos autógenos e bovinos liofilizados já foi descrita em outros estudos que mostram a eficácia do laser em regiões enxertadas. Os resultados obtidos pela análise descritiva quantitativa mostraram que a neoformação óssea foi maior nos grupos irradiados quando comparados ao controle, mostrando que a enxertia de α -TCP e β -

TCP/HA não interfere na ação biomoduladora positiva do laser, portanto, concordando com o estudo de Weber et al. (2006).

Comparando os defeitos preenchidos com β -TCP/HA pelo tempo de 21 dias, houve uma diferença significativa do grupo irradiado em relação ao grupo controle, para esta comparação verifica-se que a porcentagem média de neoformação óssea é significativamente maior para o grupo laser ($p = 0,016$). Alguns estudos relatam a relação da dose com o efeito biomodulador do laser, argumentam que uma dose maior pode resultar em um maior efeito positivo da laserterapia (Silva & Camilli, 2006).

5. Considerações Finais

Pelos resultados desta pesquisa, podemos verificar que a dose da terapia a laser com $2\text{J}/\text{cm}^2$ em cada ponto, somando $4\text{J}/\text{cm}^2$ por sessão, foi eficiente na biomodulação da osteogênese, apresentando resultados positivos nos grupos irradiados. Entretanto, outros estudos com variações de dose e relacionadas a biomateriais devem ser estimulados, a fim de esclarecer questões relacionadas ao efeito dose-dependente do laser e seus diversos modos de aplicação.

Referências

Bosco, A. F., Faleiros, P. L., Carmona, L. R., Garcia, V. G., Theodoro, L. H., de Araujo, N. J., ... & de Almeida, J. M. (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.

Diker, N., Aytac, D., Helvacioğlu, F., Dagdelen, C., & Oguz, Y. (2019). Evaluation of the Effects of Low-Level Laser Therapy on Diabetic Bone Healing. *Journal of Craniofacial Surgery*, 30(7), 1994-1998.

Eski, M., Cil, Y., Ayhan, O., Ilgan, S., & Sengezer, M. (2005). Assessment of Distraction Regenerate Using Quantitative Bone Scintigraphy: P10. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 116(3), 131-132.

Khadra, M., Lyngstadaas, S. P., Haanæs, H. R., & Mustafa, K. (2005). Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials*, 26(17), 3503-3509.

Kurashina, K., Kurita, H., Hirano, M., De Blicck, J. M. A., Klein, C. P. A. T., & De Groot, K. (1995). Calcium phosphate cement: in vitro and in vivo studies of the α -tricalcium phosphate-dicalcium phosphate dibasic-tetracalcium phosphate monoxide system. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 6(6), 340-347.

Li, Y., Weng, W., & Tam, K. C. (2007). Novel highly biodegradable biphasic tricalcium phosphates composed of α -tricalcium phosphate and β -tricalcium phosphate. *Acta Biomaterialia*, 3(2), 251-254.

Macedo, N. L. D., Matuda, F. D. S., Macedo, L. G. S. D., Gonzales, M. B., Ouchi, S. M., & Carvalho, Y. R. (2004). Bone defect regeneration with bioactive glass implantation in rats. *Journal of Applied Oral Science*, 12(2), 137-143.

Marzouk, K. M., Gamal, A. Y., Al-Awady, A. A., & Sharawy, M. M. (2007). Osteoconductive effects of vinyl styrene microbeads in rat calvarial defects. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 65(8), 1508-1516.

Mulliken, J. B., & Glowacki, J. (1980). Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. *Plastic and reconstructive surgery*, 65(5), 553-560.

Nasr, H. F., Aichelmann-Reidy, M. E., & Yukna, R. A. (1999). Bone and bone substitutes. *Periodontology 2000*, 19, 74.

Ohura, K., Bohner, M., Hardouin, P., Lemaître, J., Pasquier, G., & Flautre, B. (1996). Resorption of, and bone formation from, new β -tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: An in vivo study. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 30(2), 193-200.

Peterson, L., Ellis III, E., Hupp, J., & Tucker, M. (2003). *Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea*. (4a ed.)m

Pinheiro, A. L. B., & Gerbi, M. E. M. (2006). Photoengineering of bone repair processes. *Photomedicine and Laser Therapy*, 24(2), 169-178.

Pinheiro, A. L. B., Limeira Júnior, F. D. A., Gerbi, M. E. M., Ramalho, L. M. P., Marzola, C., Ponzi, E. A. C., ... & Gonçalves, T. O. (2003). Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, 21(5), 301-306.

Pouremadi, N., Motaghi, A., Safdari, R., Zarean, P., Rashad, A., Zarean, P., & Aminy, S. (2019). Clinical outcomes of low-level laser therapy in management of advanced implant surgery complications: A comparative clinical study. *J Contemp Dent Pract*, 20(1), 78-82.

Roberts, W.E., Garetto, L.P. (2000). Fisiologia e Metabolismo Ósseos. In: MISCH, CE. *Implantes dentários contemporâneos*. (2a ed.) São Paulo: Santos, 225-237.

Shiratori, K., Matsuzaka, K., Koike, Y., Murakami, S., Shimono, M., & Inoue, T. (2005). Bone formation in β -tricalcium phosphate-filled bone defects of the rat femur: Morphometric analysis and expression of bone related protein mRNA. *Biomedical Research*, 26(2), 51-59.

Silva, R. V., & Camilli, J. A. (2006). Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. *Journal of Craniofacial Surgery*, 17(2), 297-301.

Weber, J. B. B., Pinheiro, A. L. B., Oliveira, M. G. D., Oliveira, F. A. M., & Ramalho, L. M. P. (2006). Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. *Photomedicine and Laser Surgery*, 24(1), 38-44.

Zein, R., Selting, W., & Benedicenti, S. (2017). Effect of low-level laser therapy on bone regeneration during osseointegration and bone graft. *Photomedicine and laser surgery*, 35(12), 649-658.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

André Luiz Marinho Falcão Gondim – 40%

Gustavo Augusto Seabra Barbosa – 4%

Wagner Ranier Maciel Dantas – 4%

Euler Maciel Dantas – 4%

Henrique Telles Ramos de Oliveira – 20%

Luis Ferreira de Almeida Neto – 4%

Karolina Pires Marcelino – 4%

Rogério Miranda Pagnoncelli – 20%