

Ricardo Oliveira de Moraes

**Influência do Laser em Baixa Intensidade no
Processo de Reparo de Enxerto Ósseo Autógeno
Implantado em Bloco na Mandíbula de Ratos
Modificados Sistemicamente com Nicotina**

Estudo Histomorfométrico

Araçatuba - SP

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ricardo Oliveira de Moraes

**INFLUÊNCIA DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE NO
PROCESSO DE REPARO DE ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO
IMPLANTADO EM BLOCO NA MANDÍBULA DE RATOS
MODIFICADOS SISTEMICAMENTE COM NICOTINA
ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia da Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho",
Câmpus de Araçatuba, para obtenção do título
de "Mestre em Periodontia"

Orientador: Prof. Adjunto Alvaro Francisco Bosco

Co-orientador: Prof. Titular Valdir Gouveia Garcia

Araçatuba - SP
2010

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

- M827e Moraes, Ricardo Oliveira de.
Efeitos do laser em baixa intensidade no processo de reparo de de enxerto ósseo autógeno implantado em bloco na mandíbula de ratos modificados sistemicamente com nicotina : estudo histomorfométrico / Ricardo Oliveira de Moraes. -- Araçatuba : [s.n.], 2010
98 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2010
Orientador: Prof. Álvaro Francisco Bosco
Coorientador: Prof. Valdir Gouveia Garcia
1. Nicotina 2. Lasers 3. Terapia a laser de baixa intensidade
4. Transplante ósseo

Black D6
CDD 617.63

Dados Curriculares

Ricardo Oliveira de Moraes

Nascimento 03/06/1981

Pereira Barreto-SP

Filiação – Irair Leite de Moraes

Cleusa Maria de Oliveira

2000/2006 - **Graduação em Odontologia**

Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP/FOA

2008/2009 - **Pós-Graduação em Odontologia**

Área de Periodontia, Nível Mestrado, Faculdade de Odontologia
de Araçatuba-UNESP/FOA

A horizontal rectangular area with a pink, marbled, or textured background, serving as a decorative backdrop for the text.

Dedicatória

Dedicatória

*Ao meu eterno amigo ,
Daniel Corbucci*

O destino o levou, mas ficou registrado em nossas memórias e em nossos corações todas as partidas de futebol, a torcida pelo time do peito, as brincadeiras, as frases feitas, os conselhos, as nossas conversas ou mesmo quando em silêncio, os obstáculos superados, a vontade de se tornar um docente e construir um futuro digno, enfim, todos os sonhos divididos. Agradeço a você e a Deus por todos os momentos compartilhados durante esses anos de amizade.



*Aos meus pais ,
Irair e Cleusa*

Esse trabalho não teria a mesma importância se não fosse para dedicá-lo a vocês.
Sou muito grato por ter pais tão maravilhosos. Pelas pessoas que são, por tudo
que me ensinaram durante a vida. Por enfatizarem a importância de estudar e
buscar objetivos, sempre com honestidade e integridade. Vocês são grandes
exemplos para mim!

*Pai, nunca deixarei de lembrar de minhas raízes, do meu berço, da minha
origem, não importa em que cidade, estado ou país que eu estiver...Muito
obrigado por compreender meus sonhos e apoiar minhas decisões sem medir
esforços para me ver feliz!*

*Mãe, com seu jeito meigo de ser, sabiamente ensinou-me a respeitar as pessoas
e a ser respeitado sem precisar passar por cima dos conceitos da ética e
moral...Nenhum papel teria espaço suficiente para escrever toda a admiração e
o carinho que tenho pela senhora!*

Obrigado por acreditarem em mim e fazerem possível a realização desse sonho!
Amo vocês muito, muito, muito!

Aos meus irmãos ,

Marcos, Cristiano e Bruno

As vezes vejo nossas vidas e penso como irmãos conseguem ser tão unidos ao mesmo tempo que vivem tão longe e se vêem tão pouco...Acredito que a resposta não está somente no sentimento nato de irmandade, mas também no fato de desejarmos a felicidade do outro mais que a própria, do sentimento de proteção, do companheirismo, amizade, confiança, torcida, e , principalmente, do amor de irmão.

Agradeço a tudo que sempre fizeram por mim, ao carinho que me dedicaram e aos conselhos, entendendo minhas ausências e sempre me apoiando.

Aos meus familiares

Presentes fisicamente ou espiritualmente sempre soube do apoio e torcida, querendo ver-me galgar os degraus mais altos da vida.

Muito Obrigado.

A rectangular area with a pink and white marbled texture, serving as a background for the text.

Agradecimentos

Especiais

Agradecimentos Especiais

A Deus

Agradeço a Deus por todos os momentos maravilhosos que tenho tido em minha vida. Por todos os momentos felizes e porque não os tristes? Muitas coisas aprendi com eles, muitos valores guardei e muitas vitórias conquistei. E hoje, continuo seguindo meu caminho em busca de uma vida próspera nunca me esquecendo de ter fé em nosso senhor.

Ao meu orientador *Prof. Adj. Alvaro Francisco Bosco*, por me orientar e me ensinar que acima dos conhecimentos científicos é necessário ser humilde e honesto. Admiro sua postura com seus alunos, mantendo-se sempre sorridente e disposto a dividir seus conhecimentos. Posso dizer com convicção que o senhor tem mais um grande fã, pois aprender Periodontia sob sua orientação é muito prazeroso. Minha eterna gratidão pelo carinho e oportunidade de poder mostrar que sou capaz de lutar pelos meus objetivos.

Ao meu co-orientador *Prof. Titular Valdir Gouveia Garcia*, pela confiança, orientação, disposição em sempre ajudar. O senhor é um grande mestre e pesquisador, e mesmo sendo um profissional extremamente renomado continua sempre humilde, motivando seus alunos e sendo um exemplo a ser seguido. Muito obrigado por todos os ensinamentos!

À *Profa. Adj. Maria José Hitomi Nagata*, grande formadora de profissionais, pesquisadores e professores. Docente e pesquisadora exemplar que faz com que seus alunos aprendam a

Periodontia de uma maneira especial. Além disso, batalha para que a nossa instituição seja cada vez mais reconhecida no Brasil e no exterior. Obrigado pelos ensinamentos, carinho, paciência, apoio e amizade.

À *Profa. Dra. Leticia Helena Theodoro*, por aceitar meu convite e se dispor a fazer parte desse momento tão importante em minha vida.

Ao *Prof. José Roberto Pinto*, que mesmo repleto de compromissos aceitou meu convite no ato.

Ao *Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida*, desde minha iniciação científica ensinou-me os caminhos para ser um pesquisador. E hoje, mesmo à distância continuo admirando seu trabalho como docente e torço para que voe cada vez mais longe. Muito Obrigado!

Ao *Prof. Tetuo Okamoto* pela análise histológica desse trabalho e de todos os outros. O senhor é uma lenda dentro da odontologia. Muito Obrigado!

Ao amigo e mestrando da Odontologia Social, *Marquinho (querubim)*, pela análise estatística do trabalho.

Às grandes amigas e orientadoras, *Samara Bonfante, Danielle Shima Luize e Ana Cristina Murakawa* que apesar da distância, seus esforços, paciência e dedicação pelos meus trabalhos permitiram o enriquecimento do meu aprendizado.

Ao amigo *Murillo Rezende*, meu muito e sincero obrigado por todos os momentos que vivemos, pela amizade, pelo convívio, pelo respeito mútuo, pelo aprendizado recíproco e pelo apoio incondicional. Você foi imprescindível em todas as fases de execução deste e de outros trabalhos. Saiba que torço profundamente pelo seu sucesso pessoal e profissional e que pode contar sempre comigo, esteja onde estiver.

Aos amigos, *Thiago Martins, Leandro Araújo, Eriwan Gualberto Jr, Natália Pola, Natália Campos, Paula Falleiros, Guto e Michyele*, pelas inúmeras vezes que pude contar com vocês, tanto nas cirurgias experimentais como processamento laboratorial e atendimento dos pacientes. Aprendi muito e torço pelo sucesso de cada um. Muito obrigado!!!

Ao *Seu Odair*, o senhor foi como um pai, esteve comigo em todos os momentos durante esses anos sempre disposto a me ajudar e com uma alegria que contagia todas as pessoas ao seu redor. Meu profundo agradecimento e desejo toda felicidade para o senhor e sua família!

Aos meus amigos *Fabio Sunao, Walter (Frank), Guilherme Batistela, Carlos Henrique, Flavio Halak, Antonio Augusto (Tuco), Fabiano (Gono), Arlei Pelido, Altair, Pedro Paulo Baki, Giukiano Belizario e Rogério (Sali)* por compartilharem comigo o sonho de ser mestre.

Ao amigo *Guilherme Massarioli*, por sempre ter tido paciência nos meus momentos de dificuldade. Nunca deixou de me ajudar, além do mais, pudemos vivenciar grandes momentos de alegria. Conte sempre com minha amizade, pois tenho o carinho por você como um irmão.

À *Turma 53*, onde conquistei grandes amigos que sempre guardarei em minhas lembranças. Cada um teve participação especial em minha vida, portanto, sou muito grato a todos por nossa amizade. Contem sempre comigo!

Aos *novos amigos de Santa Catarina* pelo apoio e pela torcida. Agradeço em especial meu amigo catarinense *Fernando Augusto Salla* por me ajudar na formatação do trabalho.

À minha *cachorrinha Laurinha*, esteve comigo em todos os momentos nos últimos anos, com seu jeito travesso, mas extremamente carinhosa e companheira, sendo que me confortou em muitas situações tristes.

"O amor incondicional pode vir de várias maneiras."

John Grogan

A horizontal rectangular area with a pink, marbled, or textured background, serving as a decorative backdrop for the text.

Agradecimientos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, na pessoa do Diretor **Prof. Titular Pedro Felício Estrada Bernabé** e Vice-Diretora **Profa. Adj. Ana Maria Pires Soubhia** por proporcionar a realização desta pesquisa e crescimento profissional.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do Prof. Dr. **Idelmo Rangel Garcia Júnior**, por dispor o Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada à realização deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério, **Camilo, João e Alan**, que contribuíram, de forma ímpar, para a realização da parte experimental. Mais uma vez, obrigado.

Aos Funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada - **Bernadete, Cleide, Dirce, Gilmar e Paulo**, por sempre ter uma resolução para o que eu buscava.

A todos os funcionários e estimados amigos da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Ana Claudia Grieger Manzatti, Cláudio Hideo Matsumoto, Cláudio Marciel Júnior, Fernando Fukunishi, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Izamar da Silva**

Freitas, Luzia Anderlini e Maria Cláudia de Castro Benez, pela atenção e eficiência com que sempre me atenderam.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Diogo Reatto, Marina Midori Sakamoto Hawagoe e Valéria Queiroz Marcondes Zagatto**, pelo excelente trabalho, atenção dispensada, grande disposição em atender e ótimo relacionamento.

A todos os demais professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pela ajuda e atenção que me dispensaram.

À **Capes** pela concessão da Bolsa de Estudo.

Aos **RATOS** *todo o meu respeito!!!!!!!!!!*

Obrigado!!!

A rectangular area with a pink and white marbled pattern, serving as a background for the text.

Epigrafe

Epígrafe

“Celebrar a vida é somar amigos, experiências e conquistas,
dando-lhes sempre algum significado.
Diante de um obstáculo não cruze os braços, pois o maior
homem do mundo morreu de braços abertos.
Elogie os amigos em público, critique em particular.
Errar é humano, perdoar é divino.
Evitar a felicidade com medo que ela acabe; é o melhor meio de ser infeliz.
Faça amizade com a bondade das pessoas, nunca com seus bens!
Felicidade é a certeza de que a nossa vida não está se passando inutilmente.”

Érico Veríssimo

A rectangular area with a pink marbled background, featuring the word 'Prefácio' in a black script font.

Prefácio

Prefácio

"E assim, depois de muito esperar,
num dia como outro qualquer, decidi triunfar...

Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las.
Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução.
Decidi ver cada deserto como uma possibilidade de encontrar um oásis.
Decidi ver cada noite como um mistério a resolver.
Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz.

Naquele dia descobri que meu único rival
não era mais que minhas próprias limitações
e que enfrentá-las era a única e melhor forma de superá-las.
Naquele dia, descobri que eu não era o melhor
e que talvez eu nunca tenha sido.

Deixei de me importar com quem ganha ou perde.
Agora, me importa simplesmente saber melhor o que fazer.
Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima, e sim deixar de subir.
Aprendi que o melhor triunfo que posso ter
é ter o direito de chamar a alguém de "Amigo".

Descobri que o amor é mais que um simples estado de enamoramento,
"o amor é uma filosofia de vida".

Naquele dia, deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos passados
e passei a ser a minha própria tênue luz deste presente.

Aprendi que de nada serve ser luz se não vai iluminar o caminho dos demais.
Naquele dia, decidi trocar tantas coisas...
Naquele dia, aprendi que os sonhos são somente para fazer-se realidade.

E desde aquele dia já não durmo para descansar...
Agora simplesmente durmo para sonhar."

Walt Disney



Resumo

Moraes, RO. **Influência do laser em baixa intensidade no processo de reparo de enxerto ósseo autógeno implantado em bloco na mandíbula de ratos modificados sistemicamente com nicotina: Estudo Histomorfométrico.** (Dissertação). Araçatuba: UNESP – Universidade Estadual Paulista; 2010.

Introdução: A nicotina, uma das drogas mais nocivas a saúde, causa, entre outros fatores, morbidade do enxerto ósseo e compromete a cicatrização óssea. Por outro lado, o tratamento com laser em baixa intensidade pode proporcionar efeitos bioestimulantes, aumentando a microcirculação sanguínea da área irradiada e estimulando fibroblastos, promovendo melhores condições de cicatrização. O objetivo do presente estudo foi analisar a influência do laser em baixa intensidade sobre o processo de reparo de enxertos ósseos autógenos em bloco instalados em animais modificados sistemicamente pelos efeitos indesejáveis da nicotina.

Materiais e Métodos: Foram utilizados 72 ratos (Wistar) divididos em Grupo A (n=36), subgrupos GI e GII, submetidos à aplicação de nicotina e Grupo B (n=36), subgrupos GIII e GIV, submetidos à aplicação de solução fisiológica. Transcorridos 30 dias das aplicações, todos animais receberam enxerto ósseo autógeno na mandíbula, tendo como área doadora o osso parietal da calvária, sendo que os animais pertencentes aos subgrupos GII e GIV, receberam o tratamento com laser em baixa intensidade na interface enxerto-leito receptor. Os animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia aos 7, 14 e 28 dias pós cirurgia de enxerto. Após o processamento laboratorial de rotina foi realizada a análise histomorfométrica, visando analisar qualitativamente e quantitativamente as etapas presentes nesse processo de reparo ósseo.

Resultados: A análise histológica revelou que o grupo nicotina apresentou um atraso da atividade osteogênica na interface enxerto-leito receptor, como também menor organização do tecido de granulação em substituição ao coágulo sanguíneo. Contudo, a irradiação do tecido com laser em baixa intensidade proporcionou melhor reparo ósseo. Histometricamente, os subgrupos submetidos à irradiação laser (GII e GIV) demonstraram maior formação óssea comparados aos seus respectivos subgrupos (GI e GIII), com os resultados considerados estatisticamente significantes ($P < 0$), aos 14 dias (GI $14,27\% \pm 2,22\%$ versus GII $24,37\% \pm 11,93\%$ e GIII $24,94\% \pm 13,06\%$ versus GIV $27,53\% \pm 19,07\%$) e 28 dias (GI $36,89\% \pm 8,40\%$ versus GII $45,81\% \pm 6,03\%$ e GIII $50,31\% \pm 2,69\%$ versus GIV $58,19\% \pm 12,32\%$).

Conclusão: Após a realização de enxerto ósseo autógeno em bloco implantado na mandíbula de ratos, a influência sistêmica da nicotina levou a um atraso no processo de reparo ósseo, contudo, a irradiação com laser em baixa intensidade proporcionou uma melhor cicatrização óssea.

Palavras-chave: Nicotina, Laser, Enxerto Ósseo Autógeno, Reparo Tecidual.



Abstract

Moraes, RO. **Influence of Low level laser therapy on healing process of autogenous bone block graft installed in mandible of systemically modified rats by nicotine. Histomorphometric study.** (Dissertation). Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2010.

Background: The nicotine is one of the mostly drugs more harmful to the health cause, among other factors, morbidity of bone graft and compromises bone healing. Furthermore, treatment with low level laser can provide biostimulation effects, increasing the blood microcirculation in the irradiated area and stimulating fibroblasts promoting better healing. The aim of this study was to evaluate the influence of low level laser therapy on the healing process of autogenous bone grafts installed in block in systemic modified animals by undesirable effects of nicotine.

Methods: Were used 72 rats (Wistar) divided into Group A (n = 36) subgroups GI and GII, submitted to the application of nicotine and Group B (n = 36) subgroups GIII and GIV, submitted to the application of saline solution. After 30 days of applications, all animals received autogenous bone block graft stabilized on mandible, with the parietal bone donor area of the skull, and the animals belonging to subgroups GII and GIV received treatment with low level laser in the bed-graft interface. The animals in each group were euthanized at 7, 14 and 28 days after bone graft surgery. After routine processing was performed histomorphometric analysis in order to analyze qualitatively and quantitatively the timing sequence of bone repair.

Results: The histological analysis revealed that the nicotine group showed a delay of osteogenic activity in the bed-graft interface, as well as decreased organization of granulation tissue replacing the blood clot. However, the low level laser irradiation showed better bone healing. Histometrically, the laser subgroups (GII and GIV) demonstrated greater bone formation compared with the respective subgroups (GI and GIII), with significant statistical results ($P < 0$) at 14 days (GI $14,27\% \pm 2,22\%$ versus GII $24,37\% \pm 11,93\%$ and GIII $24,94\% \pm 13,06\%$ versus GIV $27,53\% \pm 19,07\%$) and 28 days (GI $36,89\% \pm 8,40\%$ versus GII $45,81\% \pm 6,03\%$ and GIII $50,31\% \pm 2,69\%$ versus GIV $58,19\% \pm 12,32\%$).

Conclusions: After realization of autogenous bone graft installed in the angle of mandible of rats, the systemic influence of nicotine delayed the healing process, however, the irradiation of low level laser provided better bone healing.

Key words: Nicotine, Laser, Autogenous Bone Graft, Tissue Repair.



Lista de Tabelas

Tabela 1	Número de animais nos períodos de eutanásia dentro dos grupos e subgrupos de acordo com a aplicação sistêmica e procedimento realizado.	72
Tabela 2	Média e Desvio padrão dos dados histométricos da neoformação óssea (%) na região da interface enxerto-leito receptor, de acordo com cada grupo e subgrupo nos períodos de 14 e 28 dias.	73

Lista de Figuras

Figura 1	Imagens microscópicas, grupo experimental (Nic-EO): (a) enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, 4x); (b, c, d) região da interface enxerto-leito receptor (H&E, 25x). Período de 7 dias.	74
Figura 2	Imagens microscópicas, grupo experimental (Nic-EOL): (a) enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, 10x); (b, c) região da interface enxerto-leito receptor (H&E, 25x). Período de 7 dias.	76
Figura 3	Imagens microscópicas, grupo controle (So-EO): (a) enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, 10x); (b, c) região da interface enxerto-leito receptor (H&E, 25x). Período de 7 dias.	78
Figura 4	Imagens microscópicas, grupo controle (So-EO): (a) enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, 10x); (b, c) região da interface enxerto-leito receptor (H&E, Masson, 25x). Período de 7 dias.	80

Figura 5	Imagens microscópicas, grupo experimental (Nic-EO): (a) enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, 10x); (b, c) região da interface enxerto-leito receptor (H&E, Masson, 25x). Período de 14 dias.	82
Figura 6	Imagens microscópicas, grupo experimental (Nic-EOL): (a) enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, 10x); (b, c) região da interface enxerto-leito receptor (H&E, Masson, 25x). Período de 14 dias.	84
Figura 7	Imagens microscópicas, grupo controle (So-EO): (a) enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, 10x); (b, c, d) região da interface enxerto-leito receptor (H&E, Masson, 25x). Período de 14 dias.	86
Figura 8	Imagens microscópicas, grupo controle (So-EOL): (a) enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, 10x); (b, c) região da interface enxerto-leito receptor (H&E, Masson, 25x). Período de 14 dias.	88
Figura 9	Imagens microscópicas, grupo experimental (Nic-EO): (a) enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, 10x); (b, c) região da interface enxerto-leito receptor (H&E, Masson, 25x). Período de 28 dias.	90

Figura 10	Imagens microscópicas, grupo experimental (Nic-EOL): (a) enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, 10x); (b, c) região da interface enxerto-leito receptor (H&E, Masson, 25x). Período de 28 dias.	92
Figura 11	Imagens microscópicas, grupo controle (So-EO): (a) enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, 10x); (b, c) região da interface enxerto-leito receptor (H&E, Masson, 25x). Período de 28 dias.	94
Figura 12	Imagens microscópicas, grupo controle (So-EOL): (a) enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, 10x); (b, c, d) região da interface enxerto-leito receptor (H&E, Masson, 25x). Período de 28 dias.	97

Lista de Siglas e Abreviaturas

bBGF	Fator de crescimento fibroblástico
LLLT	Laser de baixa intensidade. Expressa Low Level Laser Therapy
RPM	Rotação por minuto
GaAlAs	Arseneto de Gálio e Alumínio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HE	Hematoxilina e eosina
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina trifosfato
TG	Tecido de granulação
E	Enxerto
IN	Interface
EM	Espaço medular
FS	Fio de Sutura
OTN	Osso trabecular em Neoformação
TC	Tecido conjuntivo

Lista de Símbolos

°C	Graus Celsius
mg/ml	Miligramma por miliitro
mg/Kg	Miligramma por quilo.
%	Por cento
g	Grama
ml	Mililitro
n ^o	Número
mm	Milimetro
nm	Nanometro
mW	Miliwatt
s	Segundos
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
mm ²	Milimetro quadrado
Ltda	Limitada
µm	Micrometro

Sumário

1 Introdução	37
2 Proposição	40
3 Material e Método	42
4 Resultado	50
5 Discussão	54
6 Conclusão	60
Referências	62
Anexos	100

Manuscrito para publicação
Segundo as normas do Periódico
“Journal Periodontology”



UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

EFEITOS DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE NO PROCESSO DE REPARO DE ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO IMPLANTADO EM BLOCO NA MANDÍBULA DE RATOS MODIFICADOS SISTEMICAMENTE COM NICOTINA: Estudo histomorfométrico

Ricardo Oliveira de Moraes

Alvaro Francisco Bosco

Valdir Gouveia Garcia

Disciplina de Periodontia

Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

A rectangular area with a pink, marbled texture, serving as a background for the title.

Introdução

1 Introdução

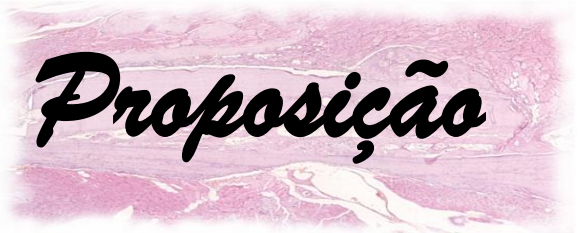
A concepção de sucesso em implantodontia está relacionada, entre outros fatores, à disponibilidade óssea da área a ser restaurada.¹ Limitações anatômicas decorrentes de traumas ou exodontias resultam em redução da massa óssea ao longo dos anos, o que normalmente limita ou até mesmo impede a colocação de implantes. Diante dessa condição, surgiram diversas opções para reconstrução do rebordo alveolar, sendo que, uma delas é a utilização de osso autógeno. Os enxertos ósseos autógenos são considerados o padrão ouro na escolha para corrigir estes defeitos ósseos devido à qualidade e a previsibilidade relativamente alta de resultados bem sucedidos por apresentar fonte de células osteogênicas e substâncias osteoindutoras.² Além disso, os enxertos ósseos autógenos apresentam vantagens como a estabilidade mecânica, que permite a instalação de implantes e não apresenta imunogenicidade.³

Dos eventos iniciais do reparo ósseo a presença de vascularização é a condição chave para a ocorrência de osteogênese.^{4,5} Dada a complexidade das etapas envolvidas no processo de reparo, convém ressaltar que vários fatores locais e/ou sistêmicos atuam retardando ou acelerando o tempo necessário para a completa reparação, onde pode-se destacar o tabagismo.

A nicotina, substância presente no cigarro, está entre as drogas mais nocivas a saúde⁶ e causa, entre outras enfermidades, vasoconstrição periférica,⁷ isquemia tecidual⁸ e diminui a tensão de oxigênio.⁹ Somado a isso, reduz a atividade do fibroblasto^{10,11} e do osteoblasto.¹² Estudos recentes têm mostrado que a nicotina interfere atrasando o processo de reparo do alvéolo após a extração dental,¹³ na cicatrização óssea de defeitos tratados através da regeneração tecidual guiada,¹⁴ leva à perda óssea na região de furca,¹⁵ uma pobre qualidade óssea ao redor de implantes com a perda tardia,¹⁶ maior retração gengival após enxerto de tecido conjuntivo,¹⁷ e retarda o processo de reparo de enxertos ósseos autógenos em bloco.¹⁸

Isto pode ser em decorrência do intenso efeito vasoconstritor desta droga sobre a microvascularização, por inibir a resposta angioblástica durante a revascularização na cicatrização dos enxertos ósseos.¹⁹

Em contra partida, a fototerapia com laser em baixa intensidade têm se tornado comum tanto em pesquisas como na clínica como um método não-invasivo para a estimulação da osteogênese e para reduzir o tempo de consolidação do reparo ósseo.^{20,21,22} Os efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade poderiam ser explicados por um aumento da proliferação de células, ou por mudanças na atividade fisiológica de células excitáveis.^{23,24} Os lasers apresentam um importante efeito positivo na produção de fator de crescimento fibroblástico bFGF²⁵ e estimulam fibroblastos, colaborando na produção de fibras colágenas mais ordenadas, determinando um melhor padrão de cicatrização nas lesões.²⁶ Esta modalidade terapêutica pode proporcionar efeitos antiinflamatórios, analgésicos e bioestimulantes, aumentando a microcirculação da área irradiada, promovendo melhores condições de reparação.²⁷ Além disso, a fototerapia com laser em baixa intensidade acelera o processo de reparo ósseo por estimular a modulação da resposta inflamatória,²⁸ estimula a osteogênese durante o estágio inicial do reparo de enxertos ósseos²⁹ e possui efeito positivo na osseointegração de implantes dentais.³⁰



Proposição

2 Proposição

Considerando-se que na prática clínica deparamos com elevado número de pacientes fumantes que necessitam de procedimentos cirúrgicos regenerativos, principalmente de enxertos ósseos autógenos, para posterior instalação de implantes, o presente estudo teve por objetivo avaliar, histomorfometricamente, a influência do laser em baixa intensidade no processo de reparo de enxertos ósseos autógenos em bloco em animais sistemicamente modificados pelos efeitos indesejáveis da nicotina.

A horizontal rectangular area with a pinkish, textured background resembling a microscopic histological section of tissue. The texture shows various shades of pink and purple with some lighter, fibrous-looking areas.

Material e Método

3 Material e Método

Para o presente estudo foram utilizados 72 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) com idade de 4 meses e peso variando entre 350g a 400g. Os animais foram obtidos junto ao biotério da Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, onde são criados para fins de ensino e pesquisa. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da referida instituição (no. 2008-003196). Os animais foram mantidos num ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), com água e ração *ad libitum*.

Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos (A e B) de 36 animais cada. Os ratos do Grupo A foram submetidos à aplicações diárias de solução de hemissulfato de nicotina (grupo nicotina), enquanto os do Grupo B receberam aplicações diárias de solução fisiológica de cloreto de sódio (grupo soro).

Administração de Nicotina e Solução Fisiológica

O hemissulfato de nicotina foi diluído em solução fisiológica na concentração de 5mg/ml, sendo administrada para cada animal um volume de solução diluída, na dosagem de 3mg/kg de peso.³¹ A cada 12 horas os animais receberam injeções subcutâneas de nicotina ou solução fisiológica (cloreto de sódio 0,9%) na região dorsal em horário pré-estabelecido por um período de 30 dias que antecederam o procedimento cirúrgico (AnexoC-fig.1). A administração da solução fisiológica de cloreto de sódio foi realizada com o objetivo de simular as mesmas condições de estresse diário proveniente das aplicações. Transcorrido o

período das aplicações, os animais dos grupos A e B foram divididos em 4 subgrupos que receberam os seguintes procedimentos:

Grupo Nicotina

- Subgrupo GI (nicotina + enxerto ósseo autógeno);
- Subgrupo GII (nicotina + enxerto ósseo autógeno + LLLT);

Grupo Soro

- Subgrupo GIII (solução fisiológica + enxerto ósseo autógeno);
- Subgrupo GIV (solução fisiológica + enxerto ósseo autógeno + LLLT).

Após os procedimentos cirúrgicos e tratamento com laser em baixa intensidade, as aplicações de nicotina e solução fisiológica continuaram até os períodos de eutanásia de 7, 14 e 28 dias.

Procedimentos cirúrgicos

Para todos os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de cloridrato de ketamina (0,7ml/100g peso corporal) associado ao cloridrato de xilazina (0,3ml/100g peso corporal) e cada animal recebeu, no pós-operatório imediato, dose única de antibiótico penicilina G benzatina (administração intramuscular de 0,2ml/animal).

Enxerto ósseo autógeno em bloco

A metodologia empregada para realização do enxerto autógeno na mandíbula dos animais foi baseada na descrição de Jardim et al,³² Luize et al³³ e Bonfante et al.¹⁸ Após anestesia do animal, tricotomia, anti-sepsia com digluconato de clorexidina 0,2% e isolamento das regiões temporal e parotídeo-massetérica direita e da região fronto-parietal, com uma lâmina de

bisturi nº 15 montada em um cabo Bard Parker nº 3, foi realizada uma incisão linear na pele, na região do ângulo da mandíbula do lado direito, paralela ao processo zigomático, permitindo a visualização do músculo masséter. Este, com auxílio de uma tesoura de ponta romba, foi divulsionado até atingir a tábua óssea mandibular (AnexoC-fig.2a/b). O periósteo do lado medial da mandíbula, juntamente com o músculo pterigóideo medial, foi descolado com auxílio de uma espátula tipo Hollembach 3S. Com o mesmo instrumental, a região foi raspada superficialmente para assegurar a completa remoção do periósteo (AnexoC-fig.3a/b) e os tecidos adjacentes afastados, permitindo melhor visualização e acesso à área receptora (AnexoC-fig.4).

Obtenção do enxerto ósseo

O enxerto ósseo doado foi obtido do osso parietal direito da calvária enquanto que a área receptora situou-se na intersecção do ramo e ângulo da mandíbula dos animais. Foi realizada uma incisão em formato de meia-lua, no tegumento de revestimento do crânio e com uma espátula do tipo Molt nº 2-4, um retalho de espessura total foi elevado. Com uma broca trefina cirúrgica (Prudent, Lins, São Paulo, Brasil) com diâmetro interno de 3,8mm montada em um motor elétrico cirúrgico, com velocidade constante de 800 RPM, e sob irrigação contínua e abundante com solução fisiológica, foi retirado o bloco ósseo da região parietal direita, abrangendo toda a espessura da cúpula. O bloco ósseo foi armazenado temporariamente em uma cuba contendo soro fisiológico estéril. Em seguida, os retalhos de tegumento foram reposicionados juntamente com o periósteo e suturados com fio de seda preta 4-0 (AnexoC-fig.5a/b).

Fixação do enxerto ósseo e Aplicação do laser de baixa potência

Com auxílio de uma broca carbide 0,5mm (KG Sorensen, Barueri, São Paulo, Brasil) adaptada ao mesmo motor já citado anteriormente, foi realizada uma perfuração na região central do enxerto ósseo. Da mesma maneira, a área receptora recebeu uma perfuração na proximidade do ângulo da mandíbula, distanciando em torno de 3mm da borda inferior (AnexoC-fig.6a/b). O enxerto foi fixado através da transpassagem de um fio de sutura 5,0 de poliéster verde trançado (Johnson & Johnson/Ethicon, Somerville, NJ) através do bloco ósseo e da mandíbula. Uma vez atado o nó na borda inferior da mandíbula, o enxerto foi estabilizado, permitindo um íntimo contato entre a superfície óssea mandibular e o enxerto ósseo (AnexoC-fig.7a/b).

Após a fixação do enxerto ao leito receptor, foi realizado o tratamento em laser de baixa intensidade de emissores InGaAlP ***TheraLaser***[®] (DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, São Paulo, Brasil) nos animais dos subgrupos GII e GIV, seguindo um protocolo com comprimento de onda de 660nm e potência de 35mW. A irradiação laser foi realizada com uma ponteira de 1mm de diâmetro, no modo contínuo, de forma pontual e em contato com a região da interface enxerto-leito receptor. A luz laser foi direcionada em 8 pontos equidistantes na interface, sendo que cada ponto foi irradiado por 3s com uma dose pontual de $4\text{J}/\text{cm}^2$ e uma varredura também de 3s contornando a área do enxerto, totalizando 27s de tempo de exposição e somando uma dose total de $36\text{J}/\text{cm}^2$ (AnexoC-fig.8a/b). Após irradiação com laser, o músculo masséter foi suturado com fio 5-0 de poliglactina 910 (Vicryl; Johnson & Johnson/Ethicon) e a pele com fio de seda preta 4-0 (Johnson & Johnson/Ethicon). Nas primeiras 48 horas após as intervenções cirúrgicas, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e receberam ração triturada e água *ad libitum*.

Processamento laboratorial

A eutanásia dos animais foi realizada aos 7, 14 e 28 dias pós-operatórios por injeção de dose excessiva de anestésico tiopental sódico (150mg/kg peso corporal), (Cristalia Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, São Paulo, Brasil). As áreas de interesse foram removidas e as peças obtidas foram fixadas em solução de formol neutro a 10% por 48 horas, lavadas durante 24 horas e descalcificadas em solução de etilenodiaminotetracetatodissódico (EDTA) a 18%, por aproximadamente 40 dias, com troca da solução a cada 7 dias. Após a descalcificação, as peças receberam tratamento laboratorial de rotina e foram incluídas em parafina, de maneira a obter cortes com 6µm de espessura. Os cortes histológicos foram realizados no sentido transversal ao plano de justaposição do enxerto ao leito receptor, a partir da borda inferior da mandíbula, abrangendo o enxerto ósseo e o osso da mandíbula. Foram obtidos cortes semi-seriados, a cada 100µm de distância, por toda a extensão do enxerto. Os 6 cortes mais centrais, excluindo-se a área da perfuração, foram corados, alternadamente, com hematoxilina-eosina (HE) e Tricrômico de Masson, para análise histológica microscópica e histométrica.

Análise histológica

Os cortes corados pela técnica de HE foram analisados, por um único avaliador calibrado e cego aos resultados, através da microscopia de luz com a descrição das características do processo de reparo ósseo, revascularização e neoformação óssea na região da interface enxerto ósseo em bloco – região do ângulo da mandíbula e regiões periféricas ao enxerto. Para análise das fibras colágenas foi utilizada a coloração de Tricrômico de Masson.

Análise histométrica

Foram selecionados dois cortes mais centrais de cada espécime, excluindo-se as da região perfurada. Cada corte foi fotografado com uma câmera digital (Axio Cam MRC 5, Zeiss) conectada a um microscópio de luz (Zeiss) e então, salvos como uma imagem digitalizada no computador. O software Imagelab 2000 (Diracon Bioinformática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil) foi usado para análise dos dados quantitativos nos períodos de 14 e 28 dias. Não foi observada formação óssea considerável no período de eutanásia de 7 dias, por isso, nesse período não foi realizada análise histométrica.

Após calibração, as medidas histométricas da área total da interface e da área de osso neoformado foram obtidas em mm^2 utilizando uma régua histológica e, posteriormente, convertidas em porcentagem. Os seguintes critérios foram usados para padronizar a análise histométrica¹⁶:

- A área total da interface foi delineada correspondendo ao espaço entre o bloco ósseo e o leito receptor. Este foi considerado 100% da área a ser analisada.
- A área de osso neoformado dentro da área total foi calculada pelo delineamento de cada unidade óssea separadamente, e então o somatório dessas unidades.

As porcentagens foram calculadas (taxa de osso neoformado / área da interface) e submetidas à análise estatística.

Análise estatística

A análise estatística dos dados histométricos obtidos foi demonstrada através da significância das diferenças entre grupos em relação às porcentagens de tecido ósseo neoformado na interface, determinada pela análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.



4 Resultado

Análise Histológica

Aos 7 dias, no grupo nicotina, subgrupo GI (Nic-EO), foi observado uma faixa de tecido conjuntivo adjacente ao enxerto ósseo com pequeno número de fibroblastos e células inflamatórias. Na região da interface, enxerto-leito receptor, observou-se remanescentes do coágulo sanguíneo e um tecido conjuntivo imaturo, com pequena quantidade de fibroblastos, ao lado de raros vasos sanguíneos, macrófagos e linfócitos (fig. 1). Já o subgrupo GII (Nic-EOL), apresentou na interface, um tecido conjuntivo mais desenvolvido com moderado número de fibroblastos ao lado de alguns linfócitos, macrófagos e pequenos vasos sanguíneos (fig. 2). No grupo soro, subgrupo GIII (So-EO), ficou evidenciado na interface enxerto-leito receptor, um tecido conjuntivo ainda com remanescentes do coágulo sanguíneo, moderado número de linfócitos e macrófagos ao lado de alguns fibroblastos e alguns vasos sanguíneos (fig.3). Essas características foram semelhantes às encontradas no subgrupo GII. No subgrupo GIV (So-EOL), observou-se na mesma interface, um tecido conjuntivo maduro, com grande quantidade de fibroblastos, vasos sanguíneos, macrófagos e linfócitos. Em algumas espécies uma discreta atividade osteogênica foi notada na interface enxerto-leito receptor e adjacente ao enxerto ósseo (fig. 4).

Aos 14 dias, o subgrupo GI (Nic-EO), demonstrou na região central da interface um tecido conjuntivo, com alguns vasos sanguíneos preenchendo parcialmente a interface enxerto-leito receptor. O tecido conjuntivo visto na periferia do enxerto estava pobremente organizado com poucos vasos sanguíneos, discreto número de fibroblastos, macrófagos e linfócitos (fig. 5). O subgrupo GII (Nic-EOL), apresentou na interface, enxerto-leito receptor, significativa quantidade de matrix óssea em neoformação. O trabeculado ósseo continha numerosos osteócitos. Osteoblastos foram observados adjacentes às bordas do tecido ósseo

neoformado, com fibras colágenas inseridas entre as células. Na maioria das espécies, havia remanescentes de tecido de granulação na interface e ao redor do enxerto. Além disso, a interface apresentava um tecido conjuntivo revascularizado e rico em fibroblastos (fig. 6). No grupo soro, subgrupo GIII (So-EO), observou-se, na interface, a presença de trabéculas ósseas neoformadas com numerosos osteoblastos em suas bordas, juntamente com um tecido conjuntivo maduro, rico em fibroblastos e vasos sanguíneos (fig. 7). O subgrupo GIV (So-EOL), demonstrou em alguns pontos da interface, enxerto-leito receptor, esse espaço praticamente ocupado por tecido ósseo neoformado. Em outras áreas da interface, notou-se menor quantidade de tecido ósseo neoformado e um tecido conjuntivo bastante maduro e vascularizado. Evidenciou-se ainda, discretas áreas de reabsorção do enxerto (fig. 8).

Aos 28 dias, o subgrupo GI (Nic-EO), apresentou poucas áreas de tecido ósseo neoformado interposto com um tecido conjuntivo pobre em fibras colágenas, poucos fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos. A maior parte dos espaços intertrabeculares ósseos foram preenchidos por tecido conjuntivo. No enxerto ósseo observou-se ainda, pequenas áreas de reabsorção (fig. 9). O subgrupo GII (Nic-EOL), demonstrou praticamente ao longo de quase toda extensão da interface, um tecido ósseo neoformado com integração da superfície interna do enxerto com o leito receptor. Em alguns pontos, no entanto, ainda observou-se áreas mais extensas com tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (fig. 10). Semelhante ao subgrupo GII, o subgrupo GIII (So-EO), apresentou grande parte da interface ocupada por tecido ósseo neoformado, ocasionando a integração do enxerto ao leito receptor ou ao menos o estreitamento desse espaço (fig. 11). Por fim, o subgrupo GIV (So-EOL), caracterizou-se por toda extensão da interface, enxerto-leito receptor, completamente ocupada por tecido ósseo neoformado (fig. 12).

Análise Histométrica

Histometricamente, o grupo nicotina teve menor formação óssea comparado com o grupo soro, no entanto, os subgrupos submetidos à irradiação laser (GII e GIV) demonstraram maior formação óssea comparados aos seus respectivos subgrupos (GI e GIII), aos 14 dias (GI 14,27% $\pm$ 2,22% versus GII 24,37% $\pm$ 11,93% e GIII 24,94% $\pm$ 13,06% versus GIV 27,53% $\pm$ 19,07%) e 28 dias (GI 36,89% $\pm$ 8,40% versus GII 45,81% $\pm$ 6,03% e GIII 50,31% $\pm$ 2,69% versus GIV 58,19% $\pm$ 12,32%), sendo que os resultados foram estatisticamente significantes ($P < 0,05$).



Discussão

5 Discussão

A metodologia do presente estudo foi baseada no trabalho de Jardini et al³² que usaram ratos machos para analisar os mecanismos biológicos e os períodos no processo de reparo de enxertos ósseos autógenos retirados da calvária e implantados na mandíbula dos animais. Deste modo o propósito desse estudo foi avaliar qualitativamente e quantitativamente a influência sistêmica da nicotina em enxertos ósseos autógenos em bloco e os efeitos biológicos do tratamento com laser em baixa intensidade na minimização dos efeitos da nicotina, enfatizando os períodos de cicatrização e as diferentes características do processo de reparo.

O método empregado para a fixação do enxerto ósseo foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Luize.³³ Nesse modelo experimental com rato, um fio de sutura foi usado para estabilizar o enxerto ósseo em bloco, evitando micromovimentos e, posteriormente, permitindo a união óssea. Em estudos prévios não publicados (projeto piloto), o uso de parafusos para a fixação do enxerto ósseo foi considerado impraticável, pois no ato da união fraturava o leito receptor devido a espessura muito delgada da mandíbula do rato para esse tipo de procedimento.

A escolha da nicotina para esse estudo foi baseada no sucesso experimental do modelo descrito por Bonfante et al¹⁸ para determinar o padrão inicial do processo de reparo dos enxertos ósseos autógenos em ratos sob a influência sistêmica da nicotina. Outros estudos experimentais em animais têm usado a nicotina adicionada a água,³⁴ adesivos com nicotina e spray nasal com nicotina,³⁵ e mini bombas osmóticas.³⁶ No presente estudo a nicotina foi administrada com injeções subcutâneas, as quais produzem níveis sanguíneos similares aos de humanos que fumam 10 a 20 cigarros / dia.³⁷ A nicotina e seus metabólitos, cotinina, têm

sido detectados na saliva, fluido gengival e urina de fumantes, sugerindo sua disponibilidade sistêmica.³⁸

Além disso, a fototerapia com laser em baixa intensidade foi realizada nesse estudo, pois seus efeitos estão relacionados com um aumento na proliferação de células, ou por mudanças na atividade fisiológica de células excitáveis.²⁴ Os lasers estimulam fibroblastos, colaborando na produção de fibras colágenas mais ordenadas, determinando um melhor padrão de cicatrização nas lesões.²⁶ Esta modalidade terapêutica pode proporcionar efeitos antiinflamatórios, analgésicos e bioestimulantes, aumentando a microcirculação da área irradiada, promovendo melhores condições de reparação.²⁷ Outros trabalhos usando um modelo experimental semelhante demonstraram que o laser teria efeitos estimulantes sobre a síntese de fibras colágenas, fibras elásticas e na proliferação de miofibroblastos,^{39, 40, 41, 42} além de reduzir a resposta inflamatória^{43, 44} fazendo com que feridas tratadas por essa luz apresentassem uma contração e epitelização mais rápida.^{45,46} O protocolo de aplicação do laser em 8 pontos e mais 1 varredura foi escolhido devido ao fato que uma única aplicação na área poderia não atingir as bordas do enxerto-leito receptor e, conseqüentemente, não atingir seus efeitos estimuladores sobre as células.⁴⁷

Os efeitos prejudiciais da nicotina nos tecidos periodontais e processo cicatricial são bem conhecidos. Macarimi et al⁴⁸ avaliaram a influência da terapia do LLLT sobre o processo de reparo de feridas cutâneas no dorso de ratos tratados com nicotina, sendo que o autor verificou que a nicotina retarda, enquanto o LLLT acelera o processo de reparo de feridas cutâneas. A terapia com laser em baixa intensidade também exerce uma ação estimulatória das células osteogênicas dos enxertos ósseos no início do processo de reparo.⁴⁹

No período de 7 dias, o subgrupo GI demonstrou um atraso no processo de reparo, apresentando na interface enxerto-leito receptor, coágulo sanguíneo, associado com uma

discreta quantidade de fibroblastos migrados da região da borda do enxerto, poucos vasos sanguíneos e células inflamatórias. Isto pode estar relacionado com o efeito inibitório da nicotina na maturação e na capacidade de proliferação dos eritrócitos. Este efeito pode ocorrer devido a combinação do monóxido de carbono com a hemoglobina no sangue, causado pela nicotina que impede a hemoglobina de transportar oxigênio para vários órgãos e tecidos do corpo.⁵⁰ A nicotina também não só interfere na revascularização inicial, que é extremamente importante para nutrição e sobrevivência das células, como retarda o estabelecimento de vasos sanguíneos com o enxerto ósseo, reduzindo a área de revascularização.¹⁹ No grupo GII, houve uma melhora do processo de reparo comparado ao GI, sendo que o GII apresentou na interface, enxerto-leito receptor, um tecido conjuntivo mais desenvolvido com maior quantidade de fibroblastos, vasos sanguíneos, macrófagos e linfócitos. A terapia com o laser em baixa intensidade têm efeitos mais pronunciados sobre órgãos ou tecidos enfraquecidos, tais como em pacientes que sofrem algum tipo de desordem funcional ou de injúrias ao tecido.⁵¹ Além disso, é evidente que os efeitos bioenergéticos, bioelétricos e bioestimuladores levam a um aumento na produção de ATP que facilita o processo de reparo celular. Em adição, esses efeitos levam a normalização do potencial iônico da membrana celular, revitalizando as funções celulares e promovendo a síntese de ATP sintetase para a produção de ácido nucléico e aceleração na divisão celular^{52,53} e sua ativação da microcirculação proporciona elevados níveis de oxigenação e nutrição para os tecidos melhorando consideravelmente o metabolismo e regeneração tecidual.⁵⁴ Os subgrupos (GIII e GIV) apresentaram maior maturação no processo de reparo tecidual em relação ao grupo experimental, devido a ausência dos efeitos sistêmicos da nicotina, mostrando maior quantidade de fibroblastos, vasos sanguíneos e atividade osteogênica em algumas espécies.

Aos 14 dias a análise histométrica indicou que a neoformação óssea na área da interface enxerto-leito receptor, foi significativamente maior nos enxertos do grupo soro comparados com o grupo nicotina, contudo, o subgrupo GII apresentou melhor resultado em relação ao GI e neoformação óssea muito próxima ao GIII (GI $14,27\% \pm 2,22\%$ versus GII $24,37\% \pm 11,93\%$ e GIII $24,94\% \pm 13,06\%$ versus GIV $27,53\% \pm 19,07\%$). Esse dado pode também ser observado através da análise histológica, na qual, o subgrupo GII apresentou significativa quantidade de matriz óssea e trabeculado ósseo em formação com numerosos osteócitos, além de grande quantidade de osteoblastos nas bordas do tecido ósseo neoformado, tecido conjuntivo vascularizado e rico em fibras colágenas. Somado a isso, a influência do laser em baixa intensidade pode estimular a deposição de cálcio, fosfato e proteínas insolúveis no tecido em cicatrização.⁵⁵ Além do mais, animais tratados com laser em baixa intensidade demonstraram nos períodos iniciais do processo de reparo uma grande produção de fosfatase alcalina, confirmando a intensa atividade osteoblástica e deposição de matrix óssea.⁵⁶ O atraso no tempo dos eventos de cicatrização pode estar relacionado com a falta da atividade osteoblástica, no grupo nicotina, a qual leva a uma menor formação óssea.^{13, 57, 58} Além disso, a nicotina leva a inibição da fibronectina e produção de colágeno do tipo I⁵⁹ e efeitos deletérios nas células ósseas e osteoprogenitoras.^{60,61} No entanto, a irradiação com laser em baixa intensidade estimula a atividade das células osteogênicas e resulta em proliferação celular e diferenciação, aumentando a formação óssea, mesmo que essa ação estimulatória do laser sobre as células osteogênicas presentes no enxerto e no leito receptor seja mais pronunciada nos estágios iniciais do processo de reparo, não ocorrendo em períodos mais tardios.⁴⁹ Somado a esse efeito o laser também promove uma maior regulação da enzima ciclo-oxigenase2 que converte o ácido aracdônico em prostanóides, modulando a resposta

inflamatória⁶² e estimula os fibroblastos, colaborando na formação de fibras colágenas mais ordenadas, determinando um melhor padrão de cicatrização e formação óssea.²⁶

No período de 28 dias, a maioria das espécies do grupo soro, apresentava sinais de incorporação do enxerto, revelada por pontes ósseas ligando a face interna do enxerto ao leito receptor. O processo de incorporação, primeiramente, resulta da reabsorção osteoclástica periférica e infiltração vascular dos canais de Volkmann e Havers.⁶³ Em contraste, o grupo nicotina apresentou menor neoformação óssea comparado ao grupo soro, pois a nicotina apresenta efeito prejudicial sob a estabilidade e densidade óssea,⁶⁴ todavia, o subgrupo GII, mostrou maior maturidade no processo de reparo ósseo em relação ao GI e semelhança ao subgrupo GIII, devido aos efeitos do laser em baixa intensidade, pois os osteoblastos são sensíveis ao laser em baixa intensidade, favorecendo a formação e remodelamento ósseo.⁶⁵ Os resultados histométricos confirmam esses achados (GI 36,89% $\pm$ 8,40% versus GII 45,81% $\pm$ 6,03% e GIII 50,31% $\pm$ 2,69% versus GIV 58,19% $\pm$ 12,32%).

Extrapolando os resultados para situações clínicas, poderíamos considerar que pacientes fumantes ou que façam uso da nicotina precisariam de períodos mais longos no pós operatório para uma completa incorporação do enxerto ósseo. Contudo, a utilização do laser em baixa intensidade proporcionaria melhores condições de cicatrização para esses pacientes. Outros estudos ainda são necessários para esclarecer a ação isolada do laser sobre o reparo ósseo em situações normais e adversas, como também sua associação com substâncias fotossensibilizadoras durante os estágios do processo de reparo dos enxertos ósseos.

A rectangular area with a pink and white marbled pattern, serving as a background for the word 'Conclusão'.

Conclusão

6 Conclusão

Dentro dos limites deste estudo, podemos concluir que após a realização de enxerto ósseo autógeno em bloco implantado na mandíbula de ratos, a influência sistêmica da nicotina levou a um atraso no processo de reparo ósseo, contudo, a irradiação com laser em baixa intensidade proporcionou uma melhor cicatrização óssea, minimizando os efeitos indesejáveis da nicotina.

A horizontal rectangular area with a pink and white marbled pattern, serving as a background for the section header.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. Bahat O. Interrelations of soft and hard tissues for osseointegrated implants. *Compend Contin Educ Dent* 1996;17:1161-1168.
2. Thaller S. Immediate bone grafting in craniofacial trauma. *Cranio Maxillofacial Trauma* 1991;408-419.
3. Iwama T, Yamada J, Imai S, Shinoda J, Funakoshi T, Sakai N. The use of frozen autogenous bone flaps in delayed cranioplasty revised. *Neurosurgery* 2003;52:591-596.
4. Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers Surg Med* 1987;7:36-45.
5. Lozano AJ, Cestero HJ Jr., Salyer KE. The early vascularization of onlay bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 1976;58:302-305.
6. Cattaneo V, et al. Volatile components of cigarette smoke: effect of acrolein and acetaldehyde on human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 2000;71:425-432.
7. Feitelson JB, et al. Two week nicotine treatment selectively increases bone vascular constriction in response to norepinephrine. *J Orthop Res* 2003;21:497-502.
8. Jones JK, Triplett RG. The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: a review of evidence and implications for patient care. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50:237-240.

9. Jensen JA, et al. Cigarette smoking decreases tissue oxygen. *Arch Surg* 1991;126:1131-1134.
10. Alpar B, et al. Nicotine-induced alterations in human primary periodontal ligament and gingival fibroblast cultures. *Clin Oral Investig* 1998;2:40-46.
11. Tanur E, et al. Effects of nicotine on the strength of attachment of gingival fibroblasts to glass and non-diseased human root surfaces. *J Periodontol* 2000;71:717-722.
12. Yuhara S, et al. Effects of nicotine on cultured cells suggest that it can influence the formation and resorption of bone. *Eur J Pharmacol* 1999;383:387-393.
13. Pinto JR, Bosco AF, Okamoto T, Guerra JB, Piza IG. Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats. A histological study. *Braz Dent J* 2002;13:3-9.
14. Saldanha JB, et al. Guided bone regeneration may be negatively influenced by nicotine administration: a histologic study in dogs. *J Periodontol* 2004;75:565-571.
15. Bosco AF, Bonfante S, Almeida JM, Luize DS, Nagata MJH, Garcia VG. A histologic and histometric assessment on the influence of nicotine on alveolar bone loss in rats. *J Periodontol* 2007; 78: 527-532.
16. César-Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Moreno H, Nociti FH. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J Periodontol* 2003;74:1454-1559.
17. Andia DC, Martins AG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH. Root coverage outcome may be affected by heavy smoking: a 2 year follow-up study. *J Periodontol* 2008;79:647-653.

18. Bonfante S, Bosco AF, Luize DS, Almeida JM, Cestari TM, Taga R. Influence of nicotine on healing process of autogenous bone block grafts in the mandible: A histomorphometric study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008;23:437-444.
19. Daftari TK, et al. Nicotine on the revascularization of bone graft. An experimental study in rabbits. *Spine* 1994;19:904-911.
20. Guzzardella GA, Torricelli P, Nicoli-Aldini N, Giardino R. Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an in vivo comparative study. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:226-232.
21. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* 1998;22:347-354.
22. Pogrel MA, Chen JW, Zhang K. Effects of low-energy galliumaluminium- arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. *Lasers Surg Med* 1997;20:426-432.
23. Karu TI. Photobiology of low - power laser effects. *Health Phys* 1989;56:691-704.
24. Ribeiro MS, Zezell DM. Laser de baixa intensidade. *Odontologia e o Laser*. 1a ed. São Paulo: Quintessence 2004;1:217-240.
25. Damante CA, Micheli G, Miyagi SPH, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci* 2008.

26. Basford JR. Low energy laser treatment of pain and wounds: hype, hope, or hokum?. Clin Proc 1986;61:671-675.
27. Mester S, Jaszszagi-Nagy E. The effect of laser radiation on wound healing and collagen biosynthesis. Stud Biophys 1973;35:227-230.
28. Pretel H, et al. Effect of low level laser therapy on bone repair: Histological study in rats. Lasers Surg Med 2007;39:788-796.
29. Silva RV, Camili JA. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low level laser. Journal Cran Fac Surg 2006;17:297-301.
30. Jakse N, et al. Influence of low level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation. Clin Oral Impl Res 2007;8:517-524.
31. Okamoto M, Kita T, Okuda H, Tanaka T, Nakashima T. Effects of aging on acute toxicity of nicotine in rats. Pharmacol Toxicol 1994;75:1-6.
32. Jardim MA, De Marco AC, Lima LA. Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: A histomorphometric study in rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005;100:666-673.
33. Luize DS, Bosco AF, Bonfante S, Almeida JM. Influence of ovariectomy on healing of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in an aged rat model. Int J Oral Maxillofac Implants 2008;23:207-214.

34. Hollinger JO, et al. Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res* 1999;45:294-301.
35. Sipe RV III, Buck DC, Hollinger JO. Nicotine administration in rabbits using Habitrol nicotine patches and nicotine nasal spray. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27:480-482.
36. Iwaniec UT. et al. Effects of nicotine on bone mass, turnover, and strength in adult female rats. *Calcif Tissue Int* 2001;68:358-364.
37. Gonzalez YM. et al. Serum cotinine levels, smoking, and periodontal attachment loss. *J Dent Res* 1996;75:796-802.
38. McGuire JR, McQuade MJ, Rossmann JA, et al. Cotinine in saliva and gingival crevicular fluid of smokers with periodontal disease. *J Periodontol* 1989;60:176-181.
39. Kana JS, Hutschenreiter G, Haina D, Waidelich W. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch Surg* 1981;116:293-296.
40. Reenstra WR, Veves A, Orlow D, et al. Decrease proliferation and cellular signaling in primary dermal fibroblasts derived from diabetcs versus non diabetic sibling controls. *Acad Emerg Med* 2001;8:519-526.
41. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR, Andrade ZDE. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras São Paulo* 2003;17:307-313.
42. Houreld N, Abrahamse H. In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm². *Photomed Laser Sur.* 2007;25:78-84.

43. Medrado AR, Pugliese LS, Reis SR, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med* 2003;32:239-244.
44. Mendez TM, Pinheiro AL, Pacheco MT, Nascimento PM, Ramamlho LM. Dose and wavelenght of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. *J Clin Laser Med Surg* 2004;22:19-25.
45. Surinchak JS, Alago ML, Bellamy RF, Stuck BE, Belkin M. Effects of low-level energy lasers on the healing of full-thickness skin defects. *Lasers Surg Med* 1983;2:267-274.
46. Al-Watban FA, Zhang XY. Comparison of wound healing process using Argon and Krypton lasers. *J Clin Laser Med Surg*. 1997;15:209-215.
47. Weber JBB, Pinheiro ALB, Oliveira MG, Oliveira FAM, Ramalho LMP. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologus bone graft. *Photomedicine and Laser Surgery* 2006;24:38-44.
48. Macarini V.C. Influência do laser em baixa intensidade (660 nm) no processo de reparo de feridas cutâneas provocadas em ratos tratados com nicotina: estudo histológico. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2004.
49. Silva RV, Camili JA. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low power laser. *J Craniofacial Surg* 2006,17:2:297-301.
50. Mosely LH, Finseth F, Goody M. Nicotine and its effect on wound healing. *Plast Reconstr Surg Baltimore* 1978;61:570-575.

51. Ribeiro M.S. Interação da radiação laser linearmente polarizada de baixa intensidade com tecidos vivos: Efeitos na aceleração de cicatrização tissular em lesões de pele. (Tese Doutorado), São Paulo: Instituto de Pesquisa Nuclear, IPEN/USP; 2000.
52. Benedicenti A. Manuale di Laser-Terapia del Cavo Orale. Ed.Maggioli, Rimini, 1982.
53. Yaakobi T, Maltz L, Oron U. Promotion of bone repair in the cortical bone of the tibia in rats by low energy laser (He-Ne) irradiation. *Calc Tiss Intl* 1996;59:297-300.
54. Pretel H, Lizarelli RFZ, Ramalho LTO. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. *Lasers in Surgery and Medicine* 2007;39:788-796.
55. Khadra M, Kasem, N, Haanaes HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:693-700.
56. Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Binderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *Journal of Oral Rehabilitation* 2006;33:619-624.
57. Fang MA, et al. Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Bone* 1991;12:283-286.
58. Fung YK, et al. Long-term effects of nicotine on bone and calciotropic hormones in adult female rats. *Pharmacol Toxicol* 1999;85:181-187.
59. Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1995;66:1056-1064.

60. Oda H, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, Wakabayashi K, Uematsu Y, Iwahashi M. Degeneration of intervertebral discs due to smoking: Experimental assessment in a rat-smoking model. *J Orthop Sci* 2004;9:135-141.
61. Akmal M, Kesani A, Anand B, Singh A, Wiseman M, Goodship A. Effect of nicotine on ipinal disc cells: A cellular mechanism for disc degeneration. *Spine* 2004;29:568-575.
62. Matsumoto MA, Ferino RV, Monteleone GF, Ribeiro DA. Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. *Lasers Med Sci* 2008.
63. Enneking WF, et al. Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *J Bone Joint Surg Am* 1975;57:237-252.
64. Rosa GM, Lucas GQ, Lucas ON. Cigarette smoking and alveolar bone in Young adults: a study using digitized radiographs. *J Periodontol* 2008;79:232-244.
65. Dominguez A, Castro P, Morales M. An In Vitro study of the reaction of human osteoblasts to low-level laser irradiation. *J Oral Laser Applic* 2009;9:21-28.

A horizontal rectangular area with a pink and white marbled texture, serving as a background for the text.

Tabelas e Figuras

Tabela 1

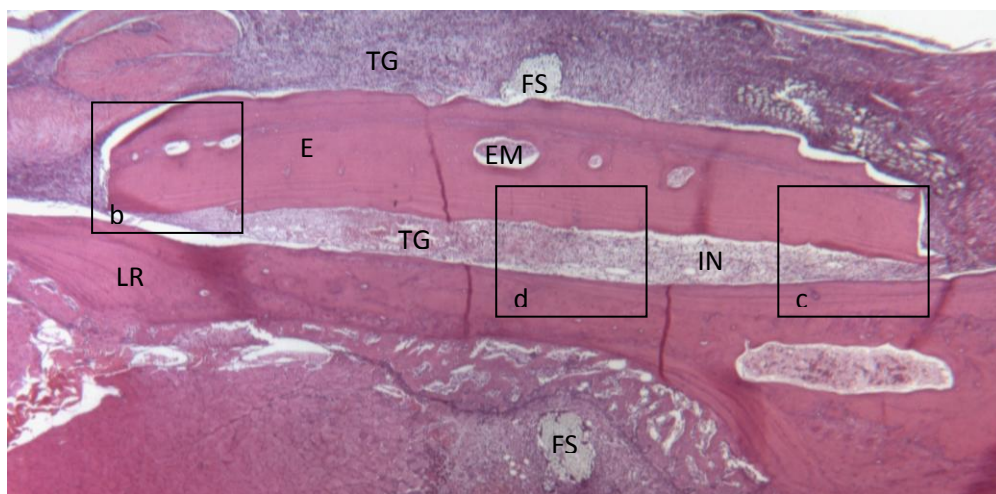
GRUPOS	SUBGRUPOS	PROCEDIMENTOS	Nº ANIMAIS/TEMPO		
			7 dias	14 dias	28 dias
A (nicotina)	GI	Enxerto ósseo autógeno	6	6	6
	GII	Enxerto ósseo autógeno + LLLT	6	6	6
B (soro)	GIII	Enxerto ósseo autógeno	6	6	6
	GIV	Enxerto ósseo autógeno + LLLT	6	6	6

Tabela 2

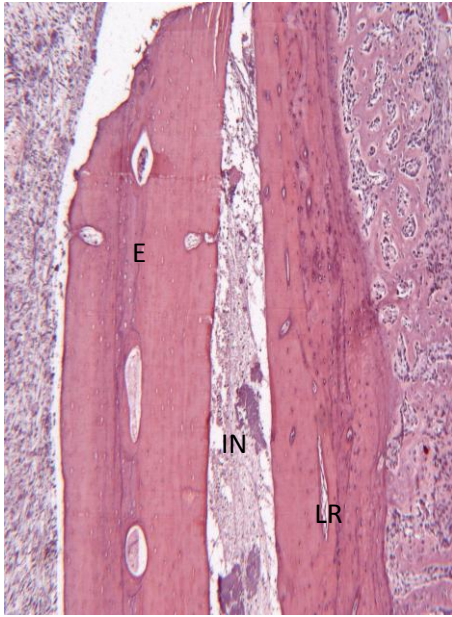
Média $\pm$ Desvio Padrão da Quantidade de Osso Neoformado em Porcentagem da Área total da Interface							
		Períodos					
		14 dias			28 dias		
Grupo		Média	DP	Letra	Média	DP	Letra
Grupo nicotina	GI	14,27	2,22	aB	36,89	8,40	bA
	GII	24,37	11,93	bA	45,81	6,03	aB
Grupo soro	GIII	24,94	13,06	bA	50,31	2,69	aB
	GIV	27,53	19,07	aB	58,19	12,32	bA

Médias $\pm$ DP seguidos por diferentes letras (letras minúsculas em colunas e letras maiúsculas em linhas) são estatisticamente diferentes (Tukey test; $P < 0.05$).

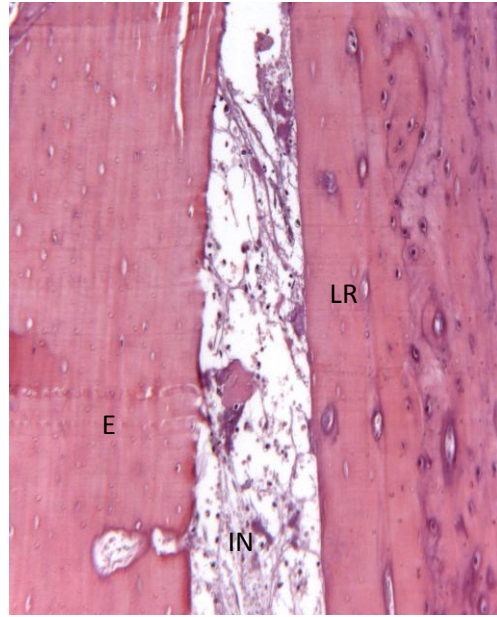
Figura 1: Grupo experimental (Nic-EO), 7 dias. (a) tecido de granulação (TG) externamente ao redor do enxerto (E) e na interface (IN). LR = leito receptor; EM = espaço medular; FS = fio de sutura (H&E, aumento 4x). (b) (H&E, aumento de 10x). (c) Detalhe da extremidade do enxerto mostrando tecido conjuntivo imaturo (H&E, aumento de 25x). (d) Detalhe da área central da interface enxerto-leito receptor mostrando coágulo sanguíneo (seta preta), células inflamatórias e fibroblastos, (H&E, aumento de 25x).



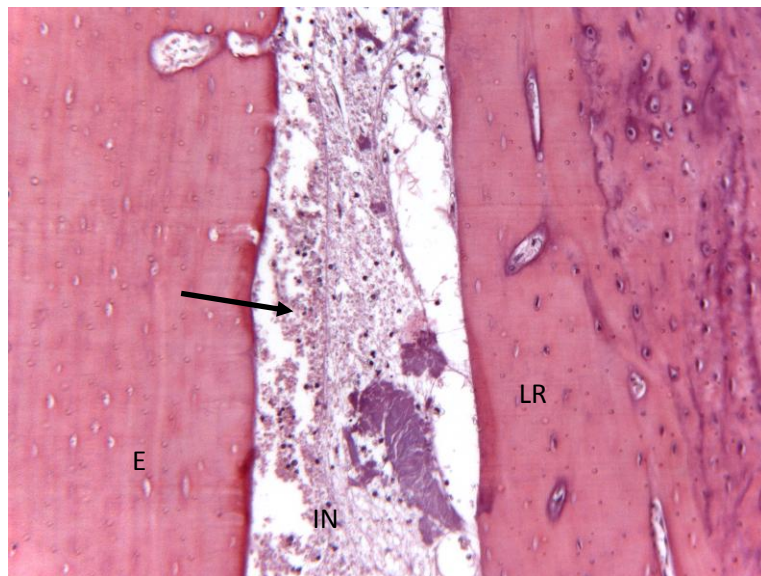
(a)



(b)



(c)

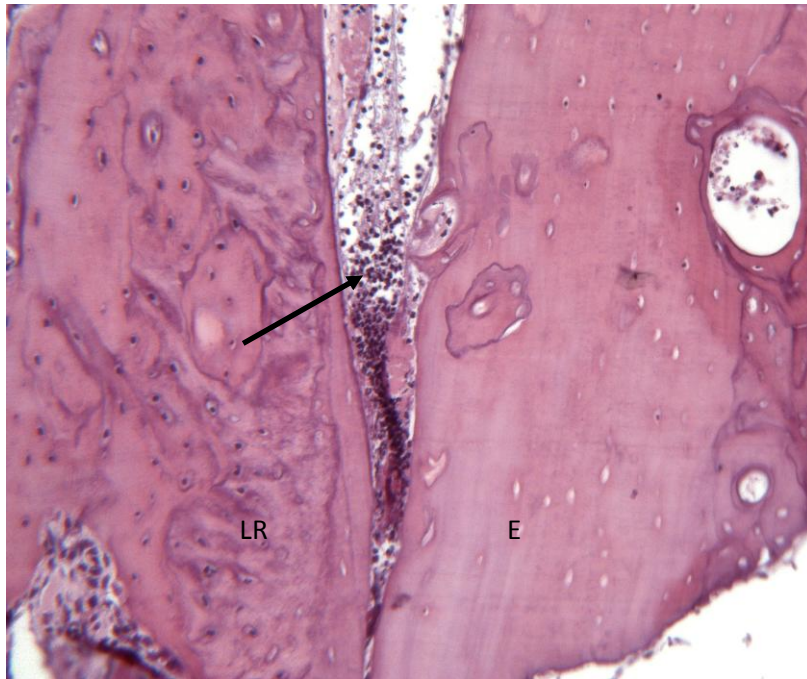


(d)

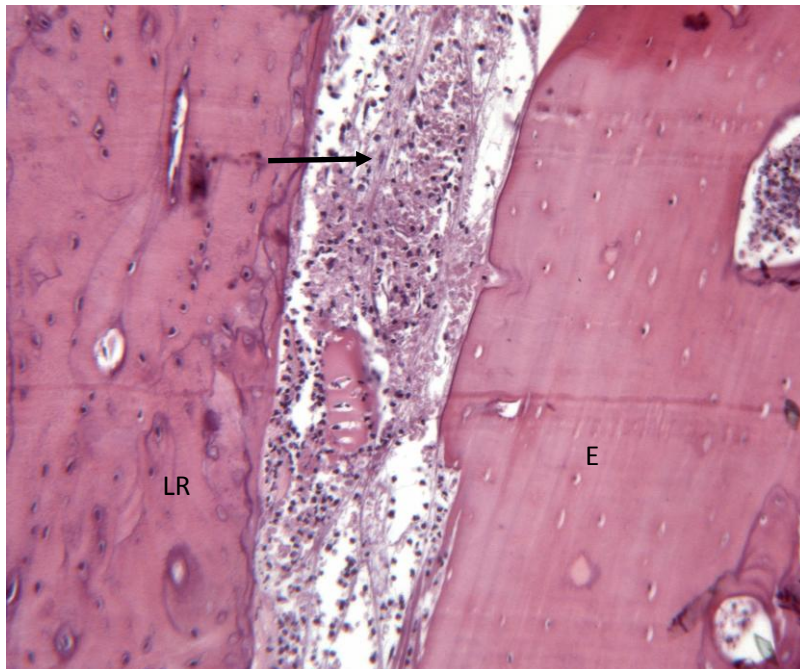
Figura 2: Grupo experimental (Nic-EOL), 7 dias. (a) Enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, aumento de 10x). (b) Detalhe da extremidade do enxerto e tecido conjuntivo na interface com células inflamatórias (seta preta), (H&E, aumento de 25x). (c) Detalhe da área central da interface enxerto-leito receptor (IN) preenchida com algum coágulo sanguíneo e tecido conjuntivo em desenvolvimento, com moderado número de vasos sanguíneos e fibroblastos (seta preta) (H&E, aumento de 25x).



(a)



(b)

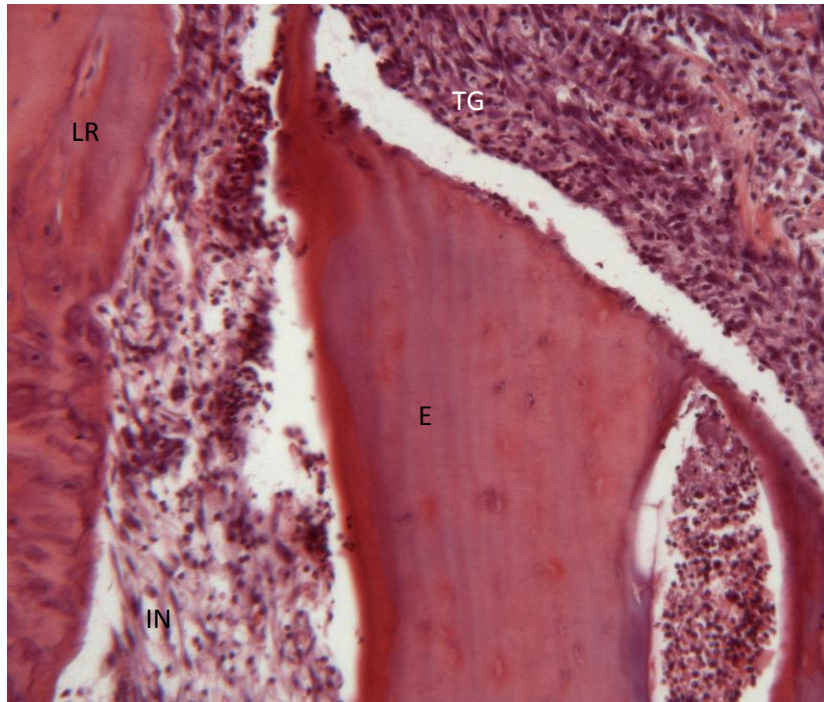


(c)

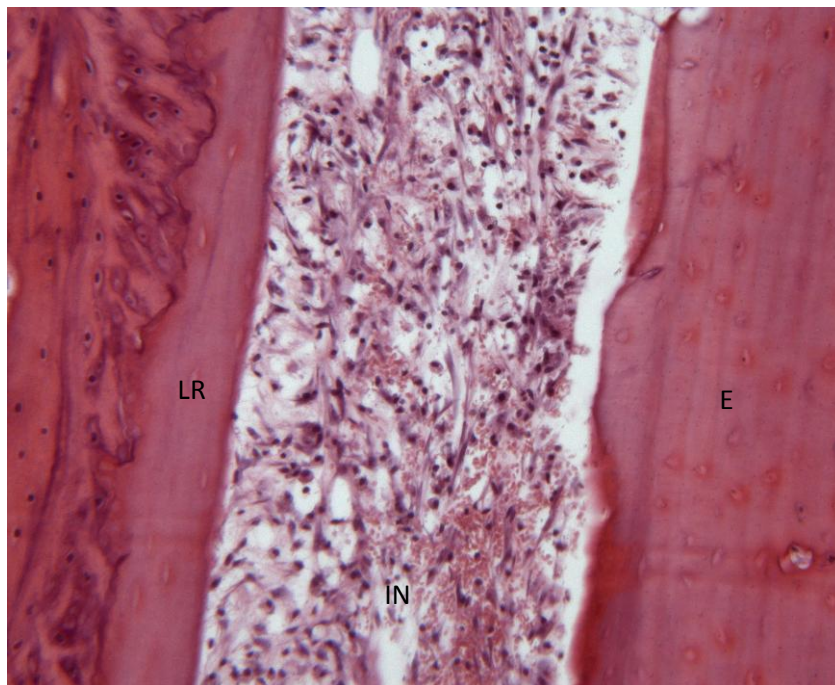
Figura 3: Grupo controle (So-EO), 7 dias. (a) Enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, aumento de 10x). (b) Detalhe da extremidade do enxerto e tecido conjuntivo na interface, mostrando fibroblastos e células inflamatórias e tecido de granulação externamente ao enxerto (TG), (H&E, aumento de 25x). (c) Detalhe da área central da interface (IN), preenchida com algum coágulo sanguíneo, vasos sanguíneos e fibroblastos (H&E, aumento de 25x).



(a)



(b)

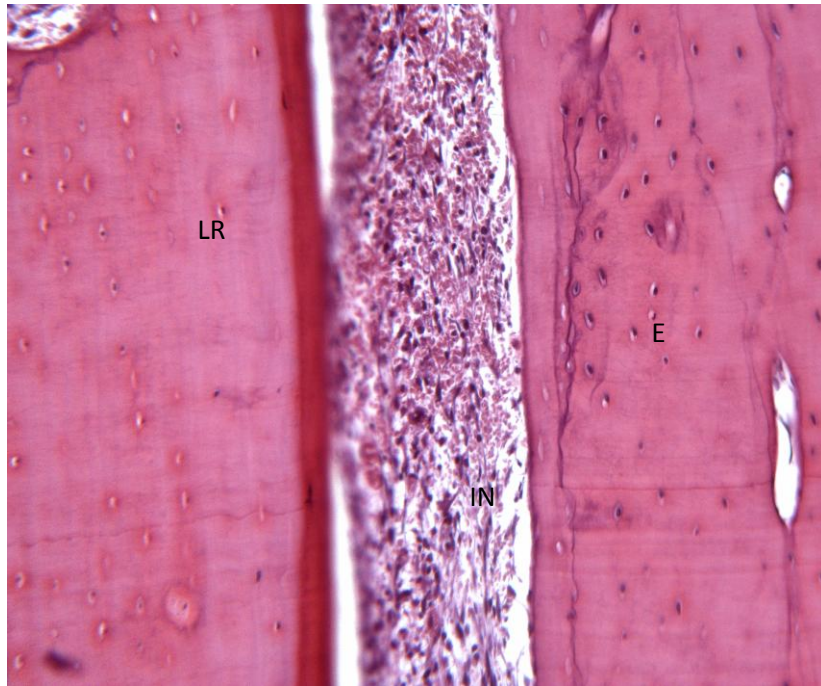


(c)

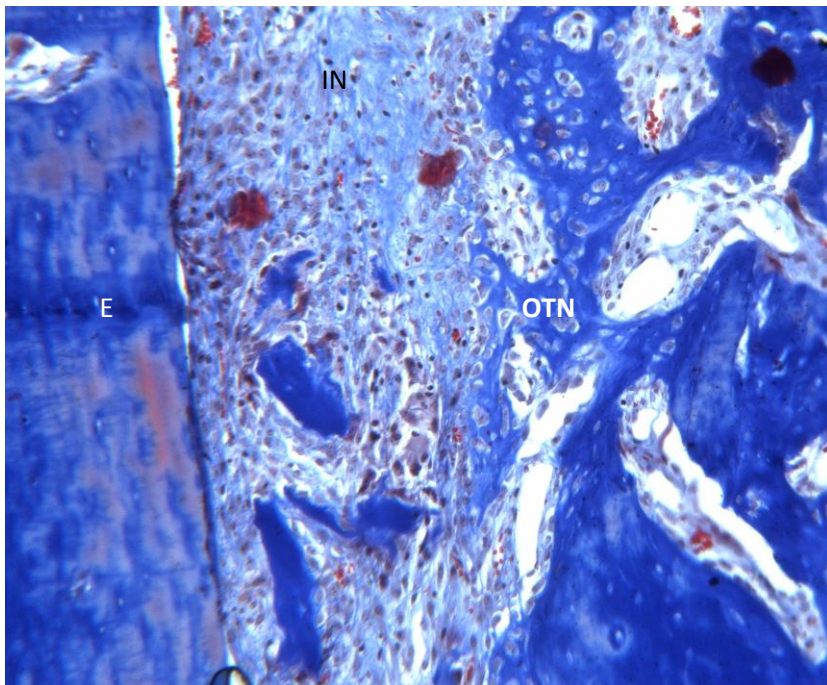
Figura 4: Grupo Controle (So-EOL), 7 dias. (a) Enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, aumento de 10x). (b) Detalhe da área central da interface enxerto leito-receptor (IN) parcialmente preenchida com tecido conjuntivo maduro, rico em fibroblastos, fibras colágenas e vasos sanguíneos (H&E, aumento de 25x). (c) Detalhe da área central da interface enxerto leito-receptor (IN) preenchida com algum osso trabecular em neoformação (OTN) e tecido conjutivo rico em fibras colágenas (Masson, aumento de 25x).



(a)

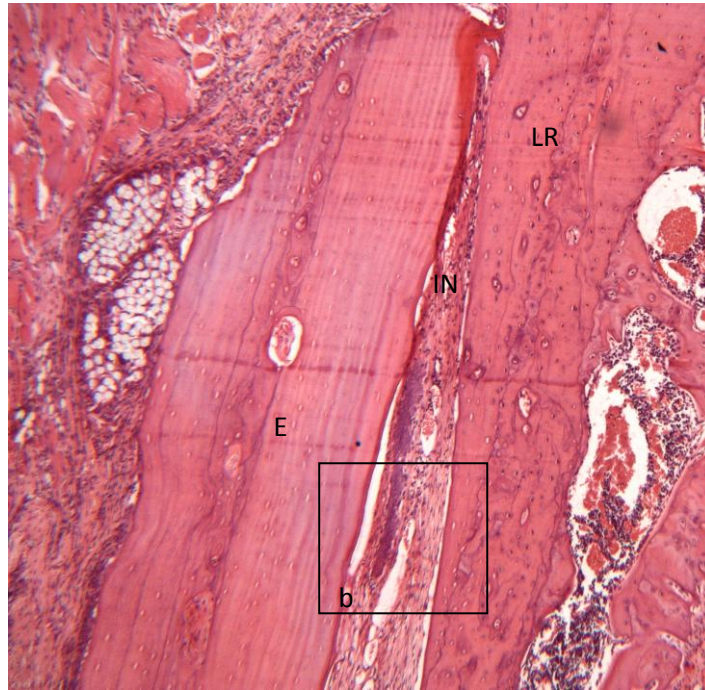


(b)

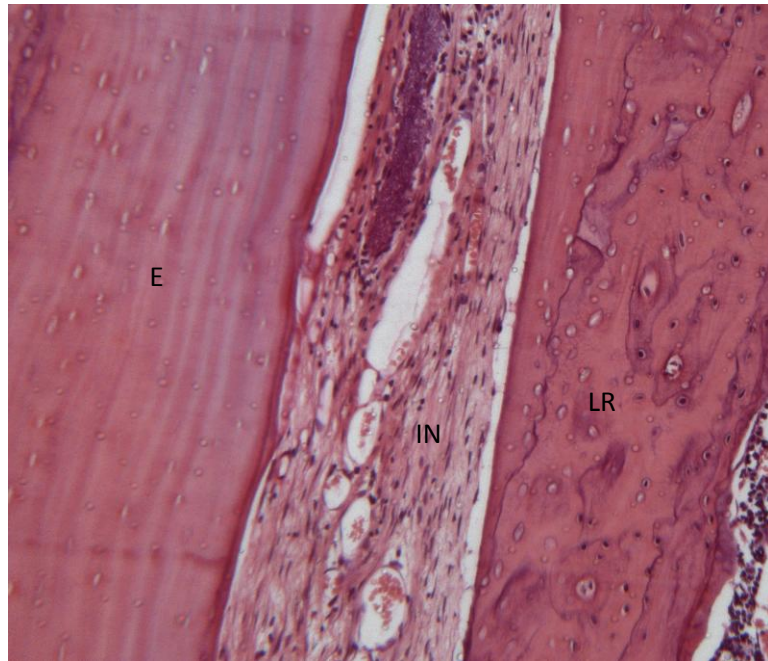


(c)

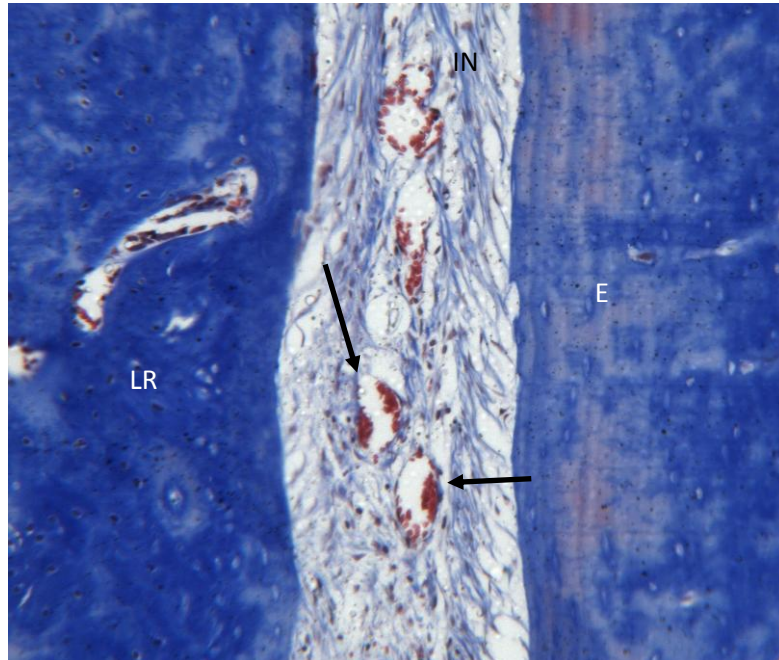
Figura 5: Grupo experimental (Nic-EO), 14 dias. (a) Enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, aumento de 10x). (b) Detalhe da área central da interface (IN), mostrando o tecido conjuntivo (H&E, aumento de 25x). (c) Detalhe da área central da interface, preenchida por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (setas), (Masson, aumento de 25x).



(a)

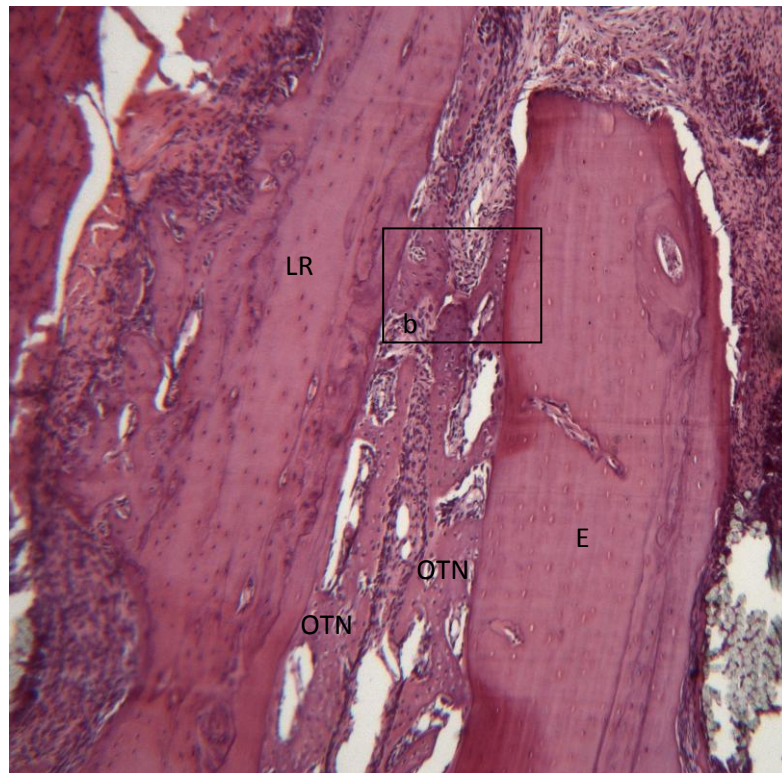


(b)

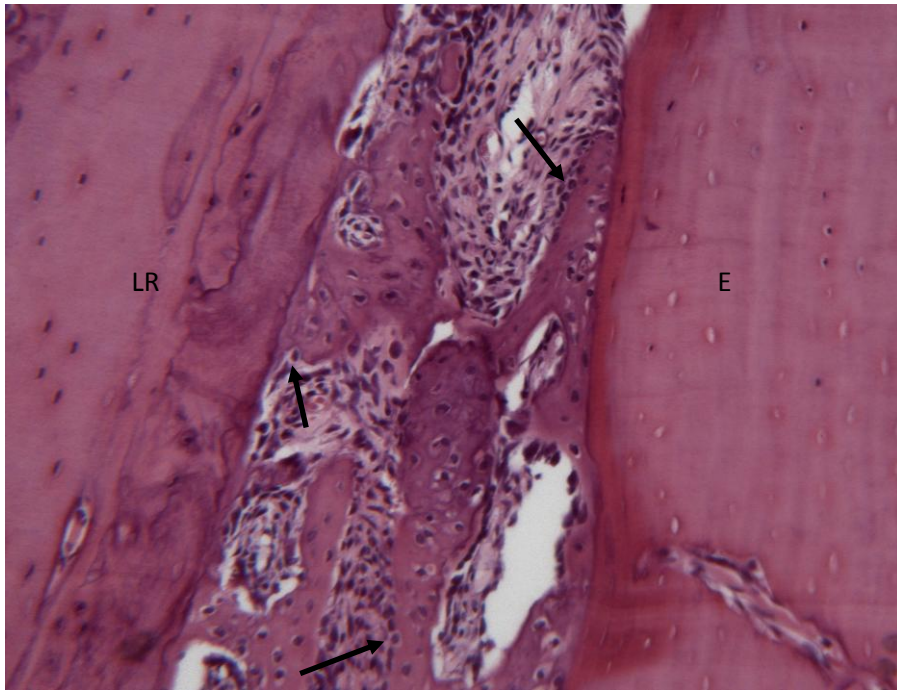


(c)

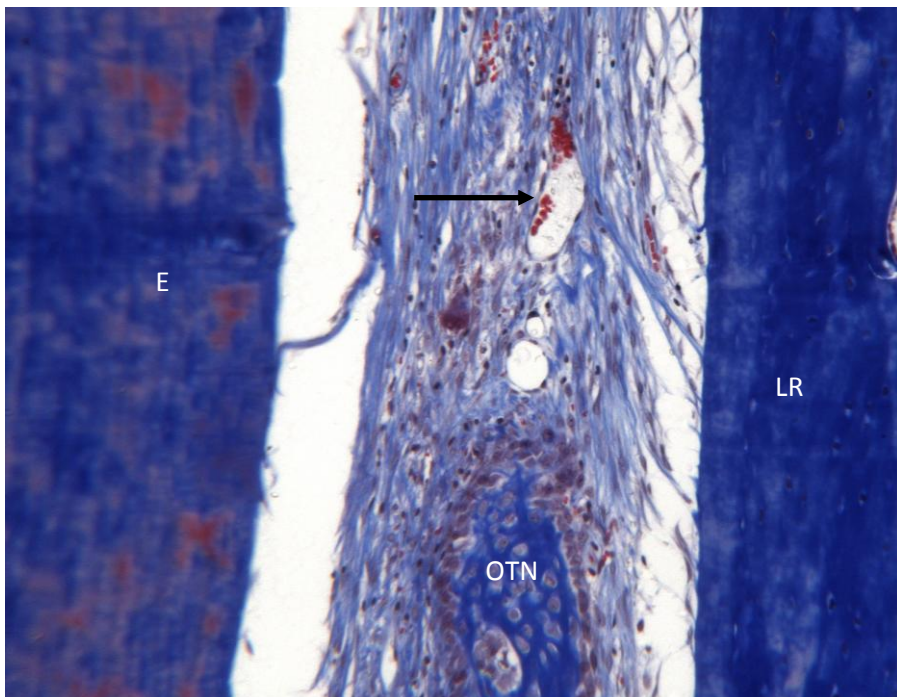
Figura 6: Grupo Experimental (Nic-EOL), 14 dias. (a) Enxerto ósseo, interface, mostrando grande quantidade de tecido ósseo em formação (OTN) e leito receptor (H&E, aumento de 10x). (b) Detalhe da área central da interface, mostrando tecido conjuntivo rico em fibras colágenas e osteoblastos na periferia do tecido ósseo em formação (setas), (H&E, aumento de 25x). (c) Área central da interface, mostrando tecido conjuntivo, vasos sanguíneos (seta) e parte do trabeculado ósseo (Masson, aumento de 25x).



(a)



(b)

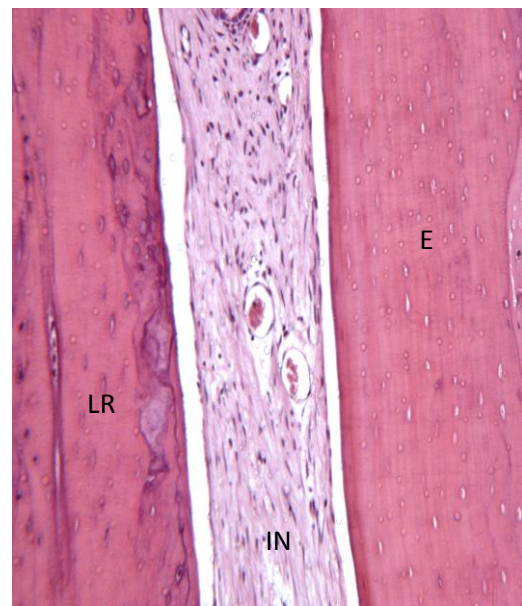


(c)

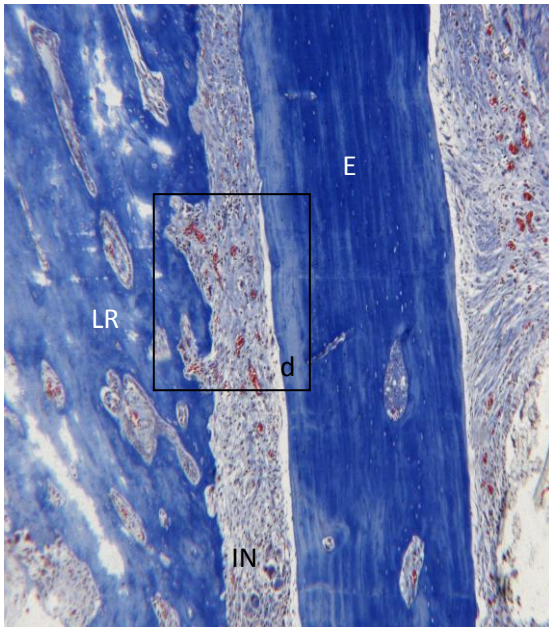
Figura 7: Grupo Controle (So-EO), 14 dias. (a) Enxerto ósseo, interface, mostrando grande quantidade de tecido ósseo em formação (OTN) e leito receptor (H&E, aumento de 10x). (b) Detalhe da área central da interface, mostrando tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (H&E, aumento de 25x). (c) Enxerto ósseo, interface e leito receptor (H&E, aumento de 10x). (d) Detalhe da área central da interface, mostrando tecido conjuntivo rico em fibras colágenas e vasos sanguíneos (setas), (Masson, aumento de 25x).



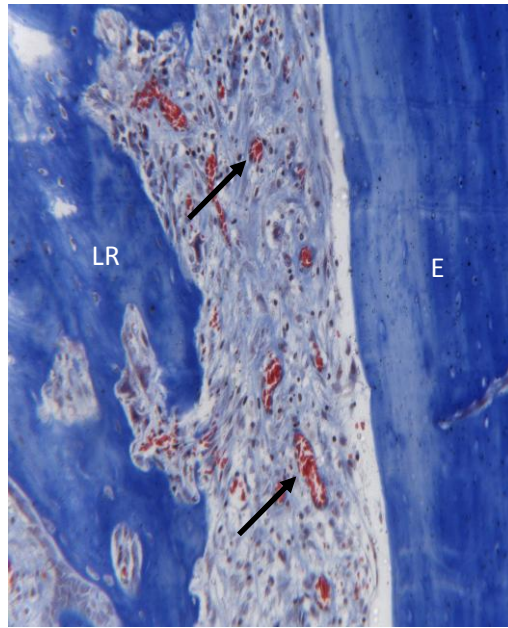
(a)



(b)

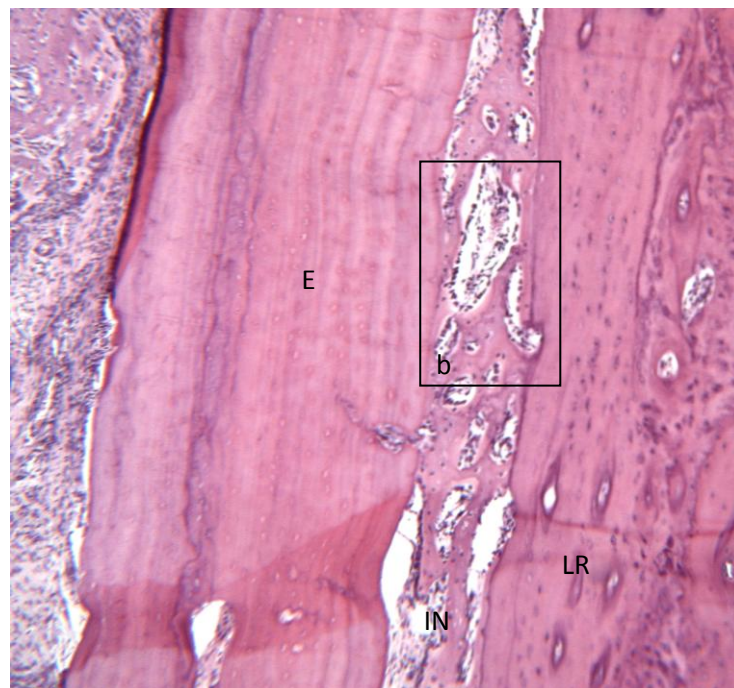


(c)

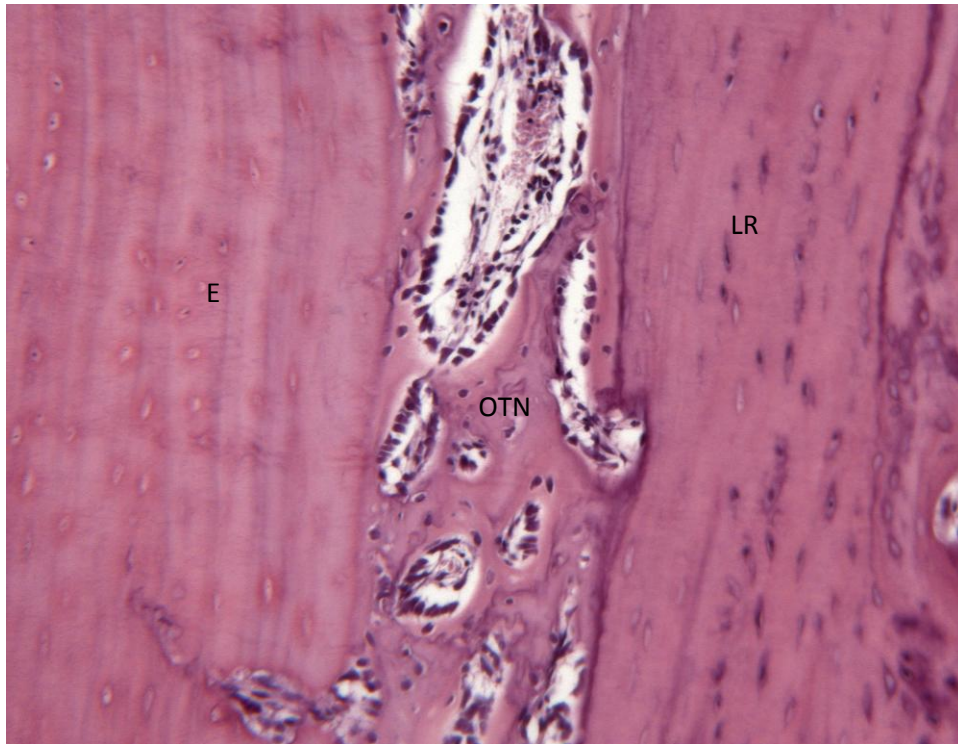


(d)

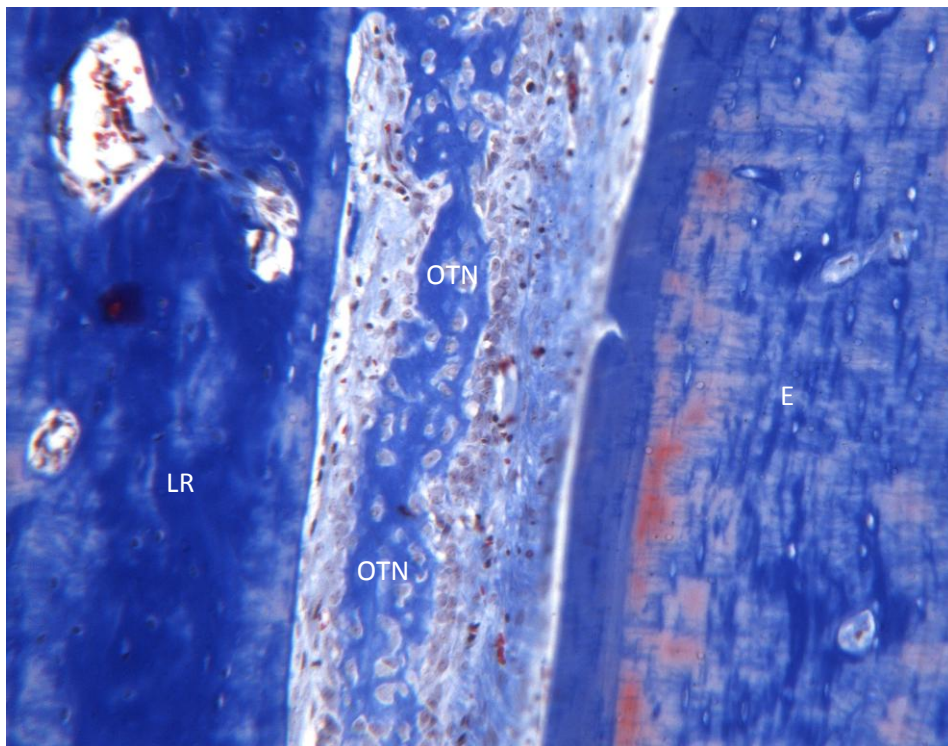
Figura 8: Grupo Controle (So-EOL), 14 dias. (a) Enxerto ósseo, interface, mostrando grande quantidade de tecido ósseo neoformado e leito receptor (H&E, aumento de 10x). (b) Detalhe da área central da interface, mostrando trabeculado ósseo neoformado (OTN) com osteoblastos na periferia interposto por tecido conjuntivo (H&E, aumento de 25x). (c) Detalhe da área central da interface, mostrando tecido ósseo neoformado (OTN), (Masson, aumento de 25x).



(a)

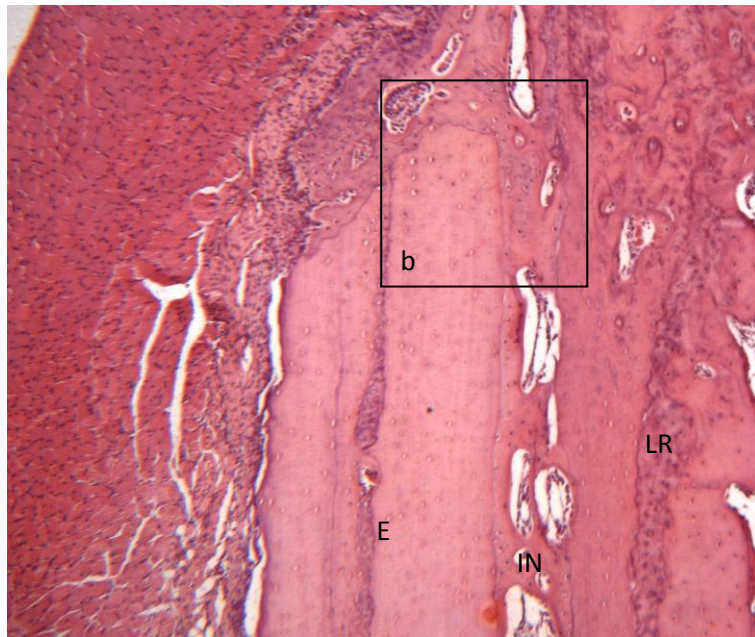


(b)

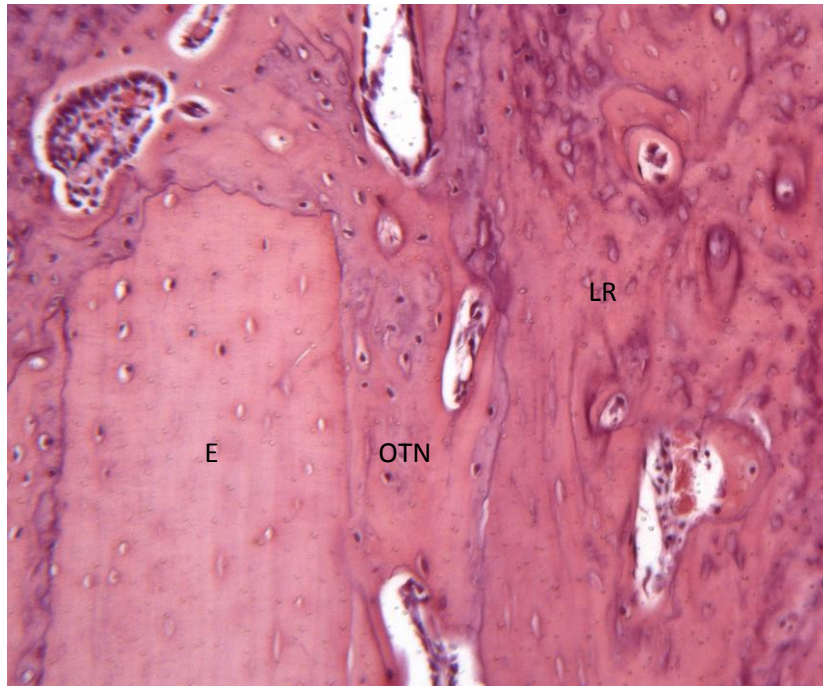


(c)

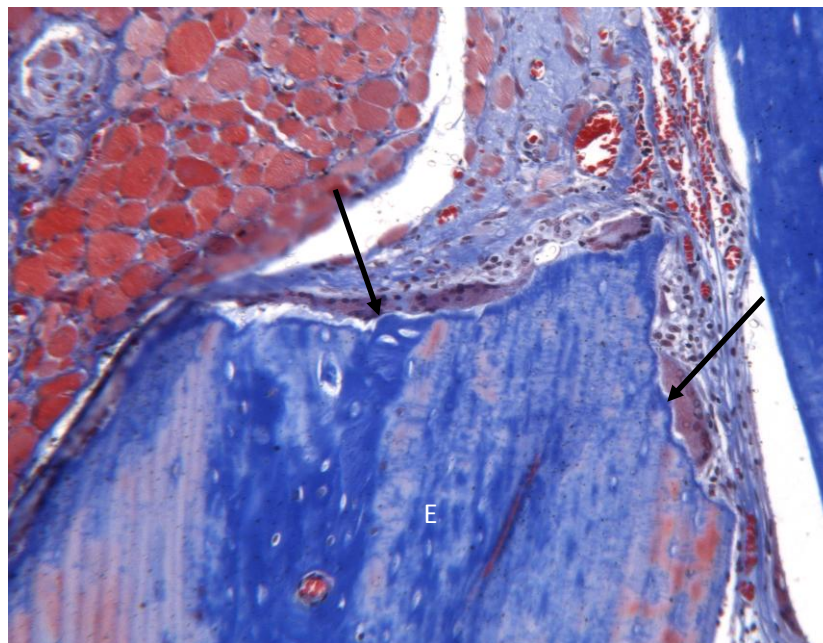
Figura 9: Grupo experimental (Nic-EO), 28 dias. (a) Enxerto ósseo, interface, mostrando pequena quantidade de tecido ósseo neoformado e leito receptor (H&E, aumento de 10x). (b) Detalhe da periferia do enxerto, mostrando tecido ósseo neoformado na interface (OTN), (H&E, aumento de 25x). (c) Detalhe da área periférica, mostrando a reabsorção da extremidade do enxerto ósseo (setas), (Masson, aumento de 25x).



(a)

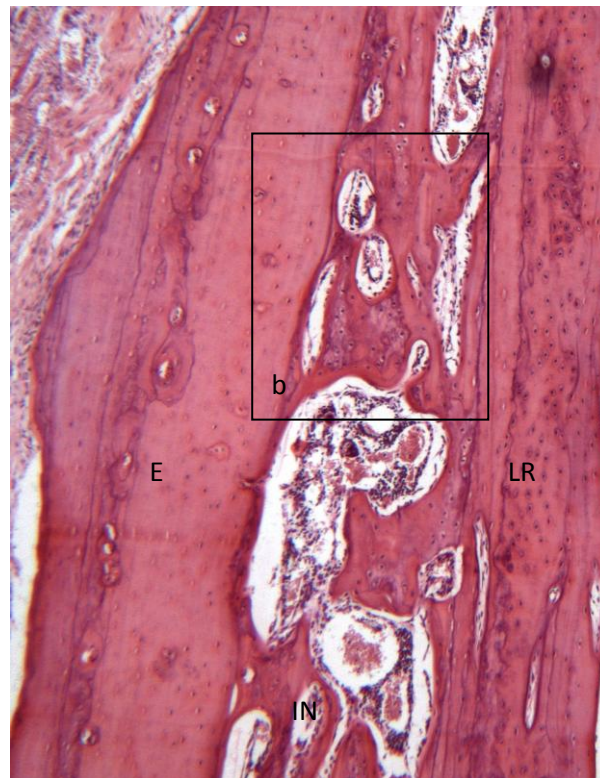


(b)

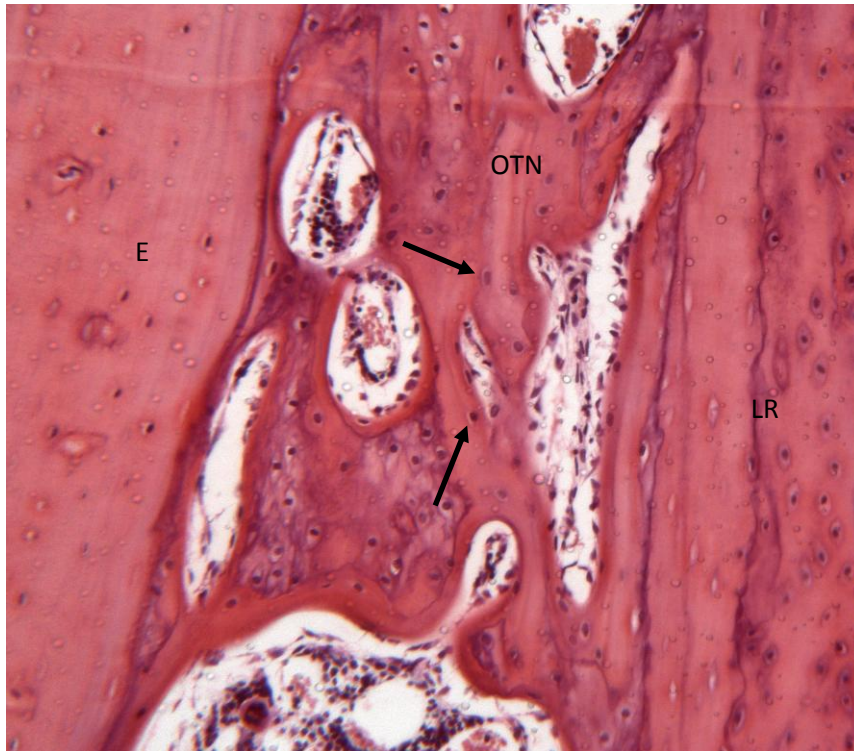


(c)

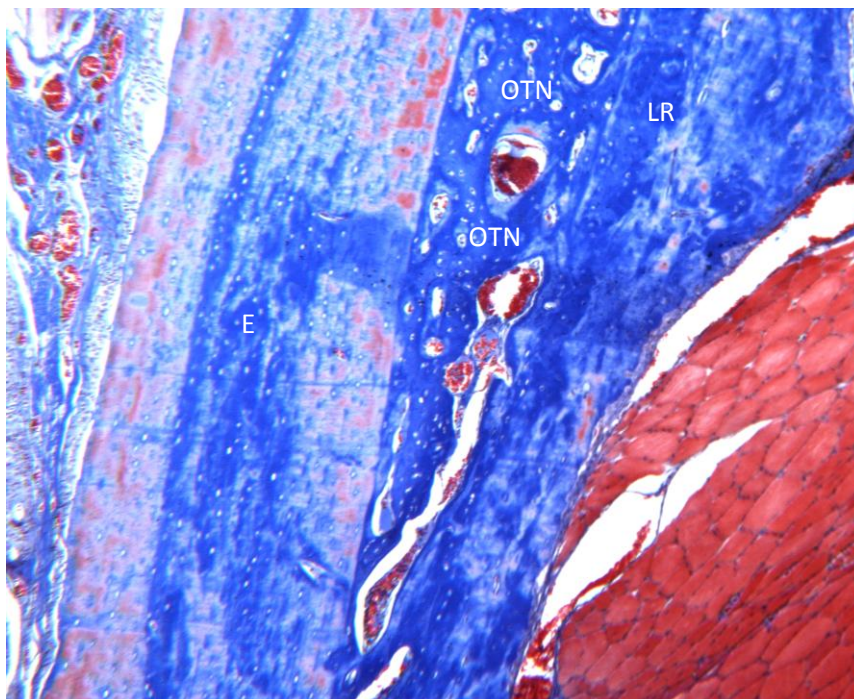
Figura 10: Grupo experimental (Nic-EOL), 28 dias. (a) Enxerto ósseo, interface, mostrando grande quantidade de tecido ósseo neoformado e leito receptor (H&E, aumento de 10x). (b) Detalhe da área central da interface, mostrando trabeculado ósseo neoformado (OTN) com osteócitos (setas) interposto por tecido conjuntivo (H&E, aumento de 25x). (c) Detalhe do tecido ósseo neoformado (OTN) com integração da superfície interna do enxerto com o leito receptor (Masson, aumento de 25x).



(a)

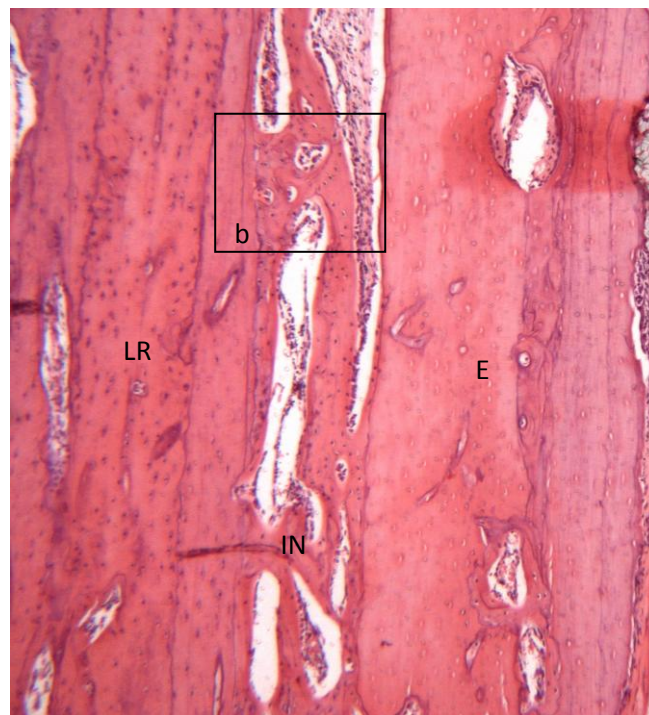


(b)

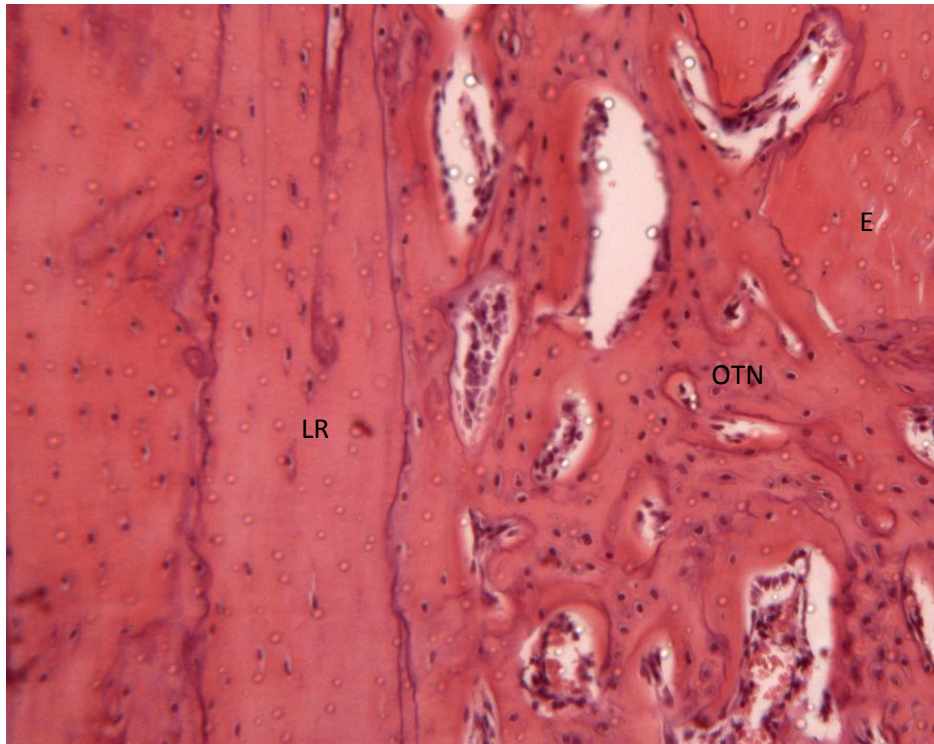


(c)

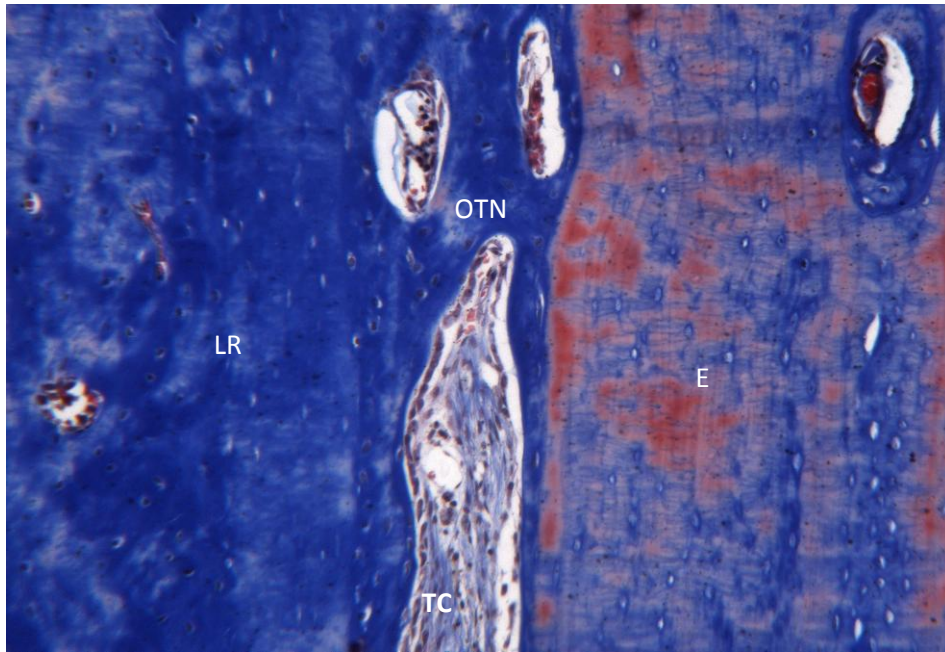
Figura 11: Grupo Controle (So-EO), 28 dias. (a) Enxerto ósseo, interface, mostrando o tecido ósseo neoformado e leito receptor (H&E, aumento de 10x). (b) Detalhe da área central da interface, mostrando trabeculado ósseo neoformado (OTN) com osteócitos (H&E, aumento de 25x). (c) Detalhe do tecido ósseo neoformado (OTN) interposto por tecido conjuntivo (TC), (Masson, aumento de 25x).



(a)

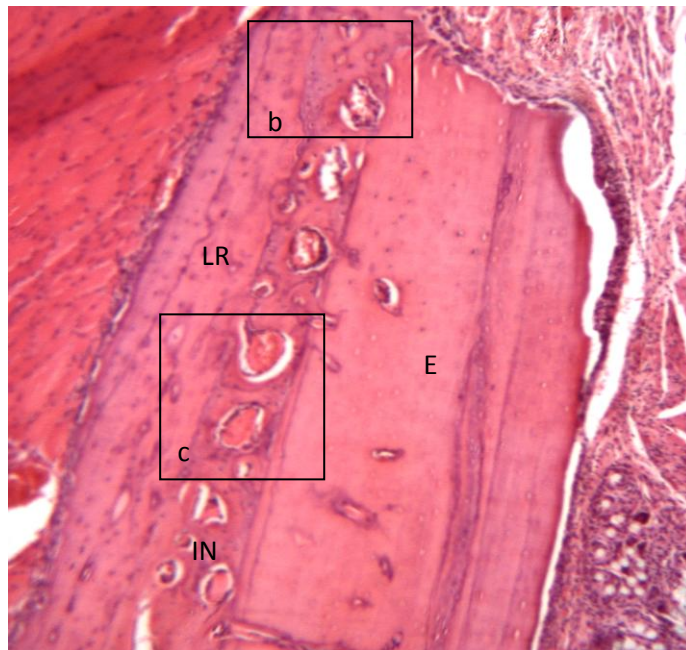


(b)

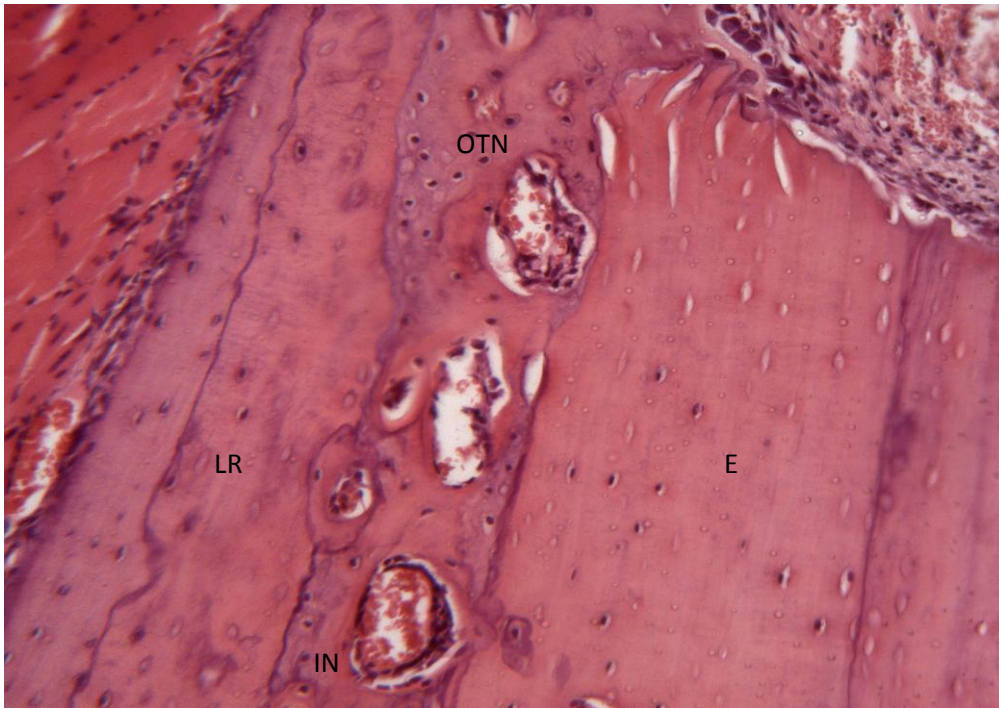


(c)

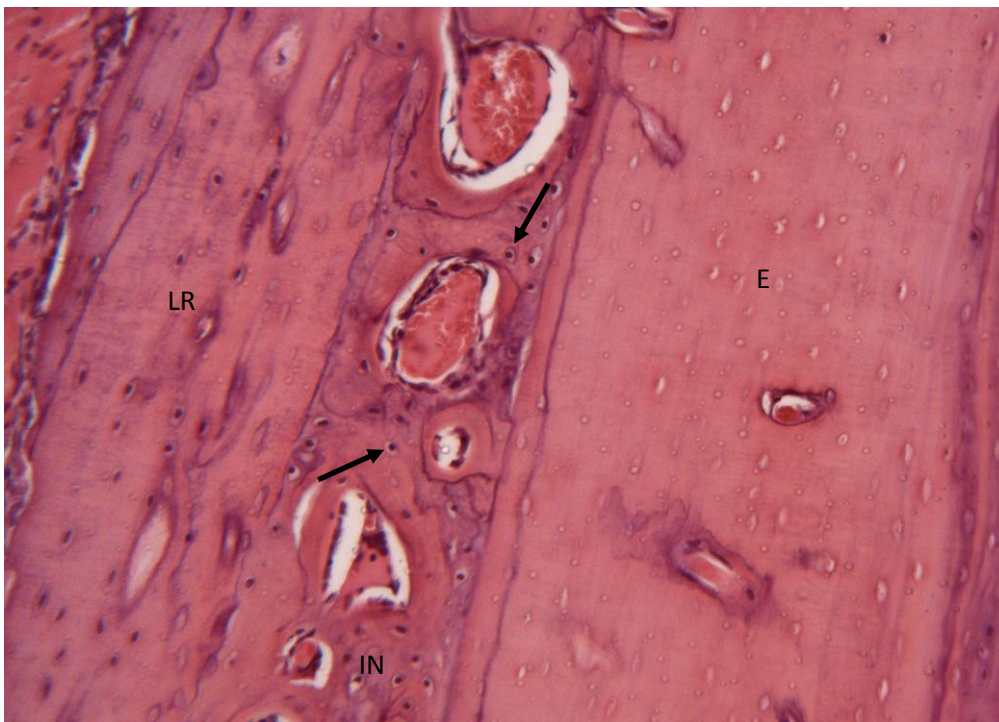
Figura 12: Grupo Controle (So-EOL), 28 dias. (a) Enxerto ósseo, interface, mostrando o tecido ósseo neoformado e leito receptor (H&E, aumento de 10x). (b) Detalhe da periferia do enxerto, mostrando o tecido ósseo neoformado (OTN), (H&E, aumento de 25x). (c) Detalhe da região central da interface enxerto-leito receptor mostrando tecido ósseo neoformado e osteócitos (setas), (H&E, aumento de 25x). (d) Tecido ósseo neoformado (OTN) por toda extensão da interface enxerto-leito receptor (Masson, aumento de 25x).



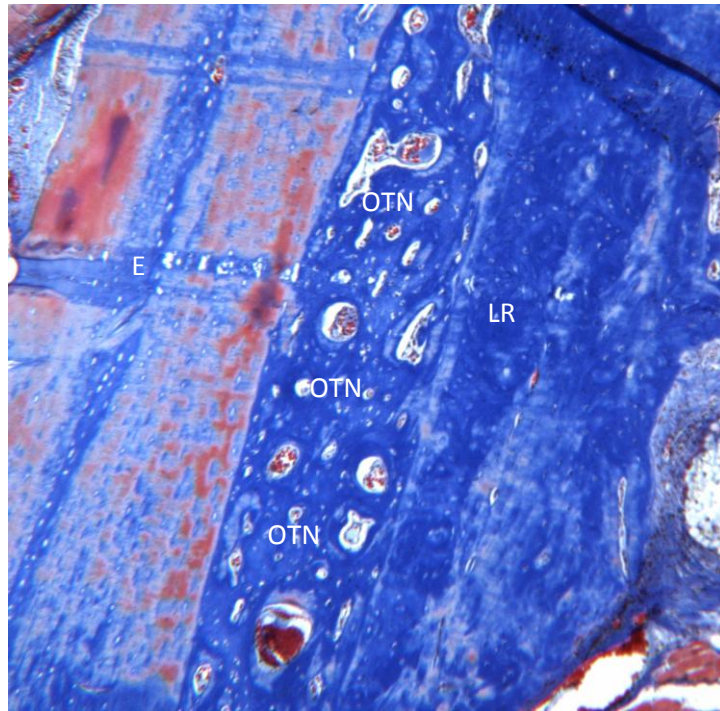
(a)



(b)



(c)



(d)



Anexo A

Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"A INFLUÊNCIA DA NICOTINA NO PROCESSO DE REPARO DE ENXERTOS ÓSSEOS AUTÓGENOS EM BLOCOS APÓS LASERTERAPIA: ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO EM RATOS"**, sob responsabilidade do Prof. Dr. **ÁLVARO FRANCISCO BOSCO** e colaboração de **RICARDO OLIVEIRA DE MORAES**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 30 de maio de 2008 de acordo com o protocolo no. 2008-003196.

Araçatuba, 06 de junho de 2008

Prof^a Dr^a CRISTINA ANTONIALI SILVA

Presidente da CEEA - FOA/UNESP

Anexo B

Normas de publicação da Revista Journal of Periodontology

Updated July 2009

This update includes revised sections on State of the Art Reviews and Case Reports and Case Series. Other revisions and important items are highlighted in boldface type.

CONTENT

The Journal of Periodontology publishes articles relevant to the science and practice of periodontics and related areas. Manuscripts are accepted for consideration with the understanding that text, figures, photographs, and tables have not appeared in any other publication, except as an abstract prepared and published in conjunction with a presentation by the author(s) at a scientific meeting, and that material has been submitted only to this journal.

MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFIC FORMATS

Submissions to the Journal of Periodontology should be limited to one of the categories defined below. Specific information regarding length and format is provided for each category. Please also refer to the instructions provided under Manuscript Submission, Preparation, and Format. All manuscripts will be reviewed by the Editors for novelty, potential to extend knowledge, and relevance to clinicians and researchers in the field. Some manuscripts will be returned without review, based on the Editors' judgment of the appropriateness of the manuscript for the Journal of Periodontology.

ORIGINAL ARTICLES

These are papers that report significant clinical or basic research on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of the different forms of periodontal disease. Papers dealing with design, testing, and other features of dental implants are also included. Format Original articles must be limited to 4,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references, and the combined number of figures and tables must be six or fewer. Multi-panel figures are acceptable. Abstract All original articles should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs:

- * Background: Describes the problem being addressed.
- * Methods: Describes how the study was performed.
- * Results: Describes the primary results.
- * Conclusions: Reports what authors have concluded from these results, and notes their clinical implications.

Introduction

The Introduction contains a concise review of the subject area and the rationale for the study. More detailed comparisons to previous work and conclusions of the study should appear in the Discussion section.

Materials and Methods

This section lists the methods used in the study in sufficient detail so that other investigators would be able to reproduce the research. When established methods are used, the author need only refer to previously published reports; however, the authors should provide brief descriptions of methods that are not well known or that have been modified. Identify all drugs and chemicals used, including both generic and, if necessary, proprietary names and doses. The populations for research involving humans should be clearly defined and enrollment dates provided.

Results

Results should be presented in a logical sequence with reference to tables, figures, and illustrations as appropriate.

Discussion

New and possible important findings of the study should be emphasized, as well as any conclusions that can be drawn. The Discussion should compare the present data to previous findings. Limitations of the experimental methods should be indicated, as should implications for future research. New hypotheses and clinical recommendations are appropriate and should be clearly identified. Recommendations, particularly clinical ones, may be included when appropriate.

STATE OF THE ART REVIEWS

These are focused reviews of basic and clinical science related to periodontics and implant dentistry. These reviews should be concise and address an important and timely clinical question. Authors should discuss clinical relevance and the impact on future understanding and practice. The review should be based on a critical assessment of the literature and should use the format and methods of a “systematic review.” Detailed descriptions of the systematic review methodology are available on the Web site of the Berkeley Systematic Reviews Group (available at: www.medepi.net/meta/) and in the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions.¹

There are many excellent published examples of systematic reviews, including “Periodontal Disease and Coronary Heart Disease Incidence: A Systematic Review and Meta-Analysis” by Humphrey et al.² Authors of systematic reviews that include a meta-analysis should refer to the QUOROM statement.³ Authors of systematic reviews without metaanalysis should refer to the reviews edited by Cook et al.⁴ and Mulrow et al.⁵

1. Higgins JPT, Green S. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions [serial on the Internet]. September 2008; version 5.0.1. Available at: www.cochrane-handbook.org.
2. Humphrey L, Fu R, Buckley D, Freeman M, Helfand M. Periodontal disease and coronary heart disease incidence: A systematic review and meta-analysis. *J Gen Intern Med* 2008;23: 2079-2086.
3. Moher D, Cook D, Eastwood S, Olkin I, Rennie D, Stroup D. Improving the quality of reports of meta-analyses of randomized controlled trials: The QUOROM statement. *Lancet* 1999;354: 1896-1900.
4. Cook D, Mulrow C, Haynes R. Systematic reviews: Synthesis of best evidence for clinical decisions. *Ann Intern Med* 1997;126:376-380.
5. Mulrow C, Langhorne P, Grimshaw J. Integrating heterogeneous pieces of evidence in systematic reviews. *Ann Intern Med* 1997;127: 989-995.

Format

The abstract should summarize the main conclusions of the review in 350 words or less. Systematic review articles should: define a clear and clinically relevant research question; retrieve and describe the limitations of previously published reviews on this topic; and justify the need for a systematic review. The review should then define the search strategy used to identify primary articles; describe the methods used to select primary studies; specify inclusion and exclusion criteria (criteria for selecting primary studies should be based on population studied, intervention or exposure, study outcomes, and study methodology); perform a blinded assessment of the quality of the selected articles; describe the reliability of this process in terms of agreement between two evaluators; account for all studies identified by the search and justify exclusions; state their conclusions; compare their conclusions to the literature and current standard of care; outline the limitations of the review; and suggest areas for future research. Papers should be balanced, literature-based reviews that are concise (2,000 to 3,000 words) with about 100 key references. Tables and figures should be limited to those essential to convey the results of the review, and the total combined number of tables and figures should not exceed six. Since critical reviews require selection of reports and interpretation of data, authors should disclose financial interest in the companies making products or providing services described in the review.

COMMENTARY

The purpose of these papers is to provide a forum for discussion of controversies and other issues as they relate to the practice of periodontics and implant dentistry. Full and balanced discussion of controversies on important issues is encouraged. This may result in several authors each presenting a relevant viewpoint. Commentary articles should be concise (2,000 to 3,000 words); however, they should be complete and balanced, which may require that the issue or controversy addressed be highly focused.

Appropriate references should be cited.

Format

Introduction

This section should clearly state the clinical question or issues to be discussed and document their importance and timeliness.

Body

The body should present the information supporting all aspects of the issues. This portion of the Commentary may be subdivided as appropriate with headings. Figures, tables, and other illustrative materials may be incorporated.

Summary

The summary should place the issue in perspective and point a way for future directions in addressing the controversy.

Acknowledgments

Since these papers allow authors to express their opinions on a subject, it is extremely important that authors disclose any and all affiliations, financial position, or any other information that constitutes a real or perceived conflict of interest.

CASE REPORTS AND CASE SERIES

The Journal of Periodontology publishes selected case reports and case series that describe unusual case presentations, complex diagnoses, and novel approaches to treatment within the scope of practice of periodontology. These case reports provide valuable information for clinicians and teachers in the field.

The requirements for patient consent, privacy, and institutional approval are well defined for manuscripts describing research on human subjects. These basic requirements are described by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) in their Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (available at: www.icmje.org) and are interpreted in the instructions to authors of all peer-reviewed biomedical journals, including the Journal of Periodontology. Due to the changing ethical and legal environment around the use of patient information, the editorial team has received multiple questions about the need for subject consent from patients described in case reports submitted for publication.

The following applies to most case reports and case series. It should be noted that the editors will determine whether specific case reports and case series require additional approvals beyond what is described below.

Requirement for Ethics Board Approval Most case reports and case series are a retrospective description of clinical findings in a case or an observed course of events that document a new aspect of patient management during the normal course of clinical treatment. Since there is no hypothesis testing, no systematic data collection beyond that which is part of routine clinical practice, no data analysis, and the work has already been done, case reports and case series do not usually qualify as “research” requiring approval from ethical boards designed to protect humans involved in clinical research. (U.S. Fed. definition: “RESEARCH is any systematic investigation, including research development, testing and evaluation, designed to develop or contribute to generalizable knowledge.”)

Example 1: Series of private practice implant cases in patients who have been taking bisphosphonates. Authors describe the findings in each case, which are collected and reported in a table format.

Example 2: Authors collect series of private practice implant cases in patients who have or have not been taking bisphosphonates.

The sample size is sufficient for data analysis, and authors analyze and report the incidence of complications.

Example 1 does not qualify as “research,” but example 2 does qualify and requires ethical approval.

Privacy in Case Reports

No patient identifiers should be included in case reports or case series. If the authors choose to include any subject identifiers, the authors must include the patient's informed consent to publish the information. Our policy conforms to the Uniform Requirements, which states: "Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying information should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that the patient be shown the manuscript to be published." It should be noted that patients may have given a signed "consent to treat," but that does not constitute permission to publish their case with personal identifiers unless they have explicitly approved the manuscript. Likewise, patient consent under government privacy rules, such as the Health Insurance Portability and Accountability Act (HIPAA) in the United States, does not constitute permission to publish their case with personal identifiers unless they have explicitly approved the manuscript.

Further information about the preparation of case reports and case series is provided below.

Case Reports

These manuscripts emphasize clinical periodontics and related oral medicine and pathology. Unusual cases illustrating lesions affecting the orofacial structures that may be expected to influence management of periodontal and implant patients could be presented. Case reports should describe:

- 1) unique cases that may represent a previously undescribed condition;
- 2) unexpected association of two or more diseases;
- 3) adverse or unexpected treatment response; or
- 4) any other clinical observation based upon well-documented cases that provide important new information.

Case Series

These papers report a sufficient number of consecutive or randomized cases to make a persuasive argument for or against the procedure, technique, or concept under discussion. Cases should be relatively homogeneous so that a systematic evaluation of one type of disease, lesion, or condition is made for the procedure under consideration. Also, treatment and documentation should be consistent and standardized for all cases. It is recognized that definitive evidence for the safety and efficacy of any procedure, drug, or device comes primarily from well-designed, randomized, controlled trials. However, well-executed case series may lead to hypotheses about the usefulness of new and innovative procedures, drugs, or devices and may therefore be of value to the progress of clinical science.

Format

Abstract

Case Reports and Case Series should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs:

- * Background: Describes the clinical situation being discussed.
- * Methods: Describes the clinical procedures (surgical and non-surgical) performed.
- * Results: Describes the clinical results.
- * Conclusions: Reports what authors have concluded, specifically clinical implications in practice situations.

Introduction

This section should include a critical review of the pertinent literature.

Case Description and Results

This section describes the case or cases, including all relevant data. For ease of presentation, tables describing longitudinal data in a chronological form may be useful. Carefully selected, high-quality clinical photographs in full color, as well as radiographs, are encouraged.

Discussion

This should include findings, put into perspective with respect to the field and literature. Unique arguments and new information gained should be summarized. Consideration of the clinical significance of the case(s) should be emphasized in all sections.

GUEST EDITORIALS

Guest Editorials may be invited or may be submitted from authorities in certain areas as a means of offering their perspective on one or more articles published in the Journal, or on other items of interest to the readership.

LETTERS TO THE EDITOR

Letters may comment on articles published in the Journal and should offer constructive criticism. If a letter comments on a published article, the author(s) will be provided 60 days to respond to the observations. Letters to the Editor may also address any aspect of the profession, including education and training, new modes of practice, and concepts of disease and its management. Letters should be brief, focused on one or a few specific points or concerns, and can be signed by no more than five individuals. Citations should be handled as standard references.

MANUSCRIPT SUBMISSION, PREPARATION, AND FORMAT

The Journal of Periodontology accepts manuscript submissions online at the following URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>. Authors should prepare manuscripts in accordance with both the instructions below and the preceding instructions provided for each manuscript category. Detailed instructions for online submission are described under “WebUploading Policies and Instructions.” Inquiries regarding current submissions should be sent to: Managing Editor, Journal of Periodontology, 737 North Michigan Avenue, Suite 800, Chicago, IL 60611-6660. Telephone: 312/573-3224; e-mail: julie@perio.org.

SUBMISSION

Authorship

Individuals identified as authors must meet the following criteria established by the International Committee of Medical Journal Editors:

- 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
- 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and
- 3) final approval of the version to be published.

Once the Journal has received a manuscript, any changes in authorship must be faxed to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Bethanne Wilson, Editorial Coordinator) and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper. Authors who are added must submit a conflict of interest and financial disclosure form (described under “Acknowledgments and Conflicts of Interest”).

Conflict of Interest and Financial Disclosure Forms

A conflict of interest and financial disclosure form must be submitted for each author. A template form can be found on ScholarOne Manuscripts (<http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>) in the upper right-hand corner under “Instructions & Forms.” More information on conflicts of interest can be found under “Conflicts of Interest” below.

PREPARATION

Style

Please follow the guidelines below when preparing the manuscript:

- * Be sure to put the genus and species of an organism and journal names in the reference section in italics.
- * The Journal of Periodontology does not italicize common Latin terms such as *in vitro*, *in vivo*, *e.g.*, or *i.e.*
- * Use block style; do not tabulate or indent material.
- * Refer to the 4th edition of the Glossary of Periodontology

Terms published by the American Academy of Periodontology for preferred terminology.

Authors are encouraged to use the disease classification as outlined in the Annals of Periodontology, volume 4 (1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions). A summary can be found on the American Academy of Periodontology Web site at <http://www.perio.org/resources-products/classification.htm>.

FORMAT

Manuscripts must be submitted in Microsoft Word. Margins should be at least 1" on both sides and top and bottom. Materials should appear in the following order:

Title Page

Abstract (or Introduction) and Key Words

Text

Footnotes

Acknowledgments

References

Figure Legends

Tables

Figures should not be embedded in the manuscript.

Authors should retain a copy of their manuscript for their own records.

TITLE PAGE

The Title Page should contain:

- 1) a concise but informative title;
- 2) first name, middle initial, and last name of each author, with the highest academic degree and the current institutional affiliation for each;
- 3) name of the department(s) and institution(s) to which the work should be attributed (please use footnote symbols [in the sequence *, †, ‡, §, ¶, #, **, etc.] to identify authors and their corresponding institutions);
- 4) disclaimers, if any;
- 5) the name and address (including fax number and e-mail) of the author(s) responsible for correspondence (please indicate whether fax number and e-mail can be published);
- 6) sources of support in the form of grants, equipment, drugs, or other significant sources of support;
- 7) any financial relationships between any author and a commercial firm that may pose a conflict of interest;
- 8) word count and number of figures and tables in the manuscript;
- 9) a short running title of no more than 60 characters, including spaces; and
- 10) a one-sentence summary describing the key finding(s) from the study.

ABSTRACT OR INTRODUCTION

Please see specific instructions provided for each manuscript category.

KEY WORDS

A maximum of six key words or short phrases, drawn from MeSH documentation, to facilitate indexing should be listed below the abstract.

TEXT

Please see specific instructions provided for each manuscript category.

ACKNOWLEDGMENTS AND CONFLICTS OF INTEREST

Acknowledgments

At the end of the Discussion, acknowledgments may be made to individuals who contributed to the research or the manuscript preparation at a level that did not qualify for authorship. This may include technical help or participation in a clinical study. Authors are responsible for obtaining written permission from persons listed by name. Acknowledgments must also include a statement that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author.

Conflicts of Interest

In the interest of transparency and to allow readers to form their own assessment of potential biases that may have influenced the results of research studies, the Journal of Periodontology now requires that all authors declare potential competing interests related to papers accepted for publication. Conflicts of interest are defined as those influences that may potentially undermine the objectivity or integrity of the research, or create a perceived conflict of interest.

Authors are required to submit:

1) A statement in the manuscript, following Acknowledgments, that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author. If an author has no commercial relationships to declare, a statement to that effect should be included. This statement should include financial relationships that may pose a conflict of interest or potential conflict of interest. These may include financial support for research (salaries, equipment, supplies, travel reimbursement); employment or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper; and personal financial interests such as shares in or ownership of companies affected by publication of the research, patents or patent applications whose value may be affected by this publication, and consulting fees or royalties from organizations which may profit or lose as a result of publication. An example is shown below.

2) A conflict of interest and financial disclosure form for each author. This form can be found on Scholar-One Manuscripts (<http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>) in the upper right-hand corner under "Instructions & Forms." The form should be completed by each author and provided to the corresponding author. The corresponding author is responsible for submitting these forms from each author when the manuscript is submitted. These forms should be sent to Bethanne Wilson, Editorial Coordinator, either via e-mail at bethanne@perio.org or fax at 312/573-3225. These forms can also be uploaded in the cover letter area during the manuscript submission process. Conflict of interest information will not be used as a basis for suitability of the manuscript for publication.

Example of Conflict of Interest Statement:

This study was supported by a grant from the Acme Implant Corporation, Seoul, Korea. Drs. Able, Kim, and Bruce report no financial relationships related to any products involved in this study. Dr. Lee is on the scientific advisory board for Acme Implant Corporation and gives lectures sponsored by the company. Dr. Smith is a consultant and shareholder of the Brownstone Implant Corporation, Boston, MA. Dr. Wang is employed full-time as chief technical officer of the Acme Implant Corporation.

REFERENCES

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text. A journal, magazine, or newspaper article should be given only one number; a book should be given a different number each time it is mentioned, if different Page numbers are cited. All references are identified, whether they appear in the text, tables, or legends, by Arabic numbers in superscript. Journal title abbreviations should be those used by the U.S. National Library of Medicine. If you are uncertain about the correct abbreviation for a journal title, please refer

to the NLM's comprehensive listing at <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>. The use of abstracts as references is strongly discouraged. Manuscripts accepted for publication may be cited. Material submitted, but not yet accepted, should be cited in text as "unpublished observations." Written and oral personal communications may be referred to in text, but not cited as references. Please provide the date of the communication and indicate whether it was in a written or oral form. In addition, please identify the individual and his/her affiliation. Authors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. Presented papers, unless they are subsequently published in a proceedings or peer-reviewed journal, may not be cited as references. In addition, Wikipedia.org may not be cited as a reference. For most manuscripts, authors should limit references to materials published in peer-reviewed professional journals. In addition, authors should verify all references against the original documents. References should be typed double-spaced. Examples of references are given below. Authors are encouraged to consult EndNote for the Journal of Periodontology's preferred reference style.

Journals

1. Standard journal reference. Note: list all authors if six or fewer; when seven or more, list only first three and add et al. Glass DA, Mellonig JT, Towle HJ. Histologic evaluation of bone inductive proteins complexed with coralline hydroxyapatite in an extraskeletal site of the rat. *J Periodontol* 1989;60:121-125.
2. Corporate author. Federation Dentaire Internationale. Technical report no. 28. Guidelines for antibiotic prophylaxis of infective endocarditis for dental patients with cardiovascular disease. *Int Dent J* 1987;37:235.
3. Journal paginated by issue. Card SJ, Caffesse RG, Smith BA, Nasjleti CE. New attachment following the use of a resorbable membrane in the treatment of periodontitis in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1989;9(1):59-69.
4. Non-English-language titles translated into English. Buchmann R, Khoury F, Hesse T, Müller RF, Lange DE. Antimicrobial therapy of peri-implant disease (in German). *Z Zahna"rztl Implantol* 1996;12:152-157. Books and Other Monographs
5. Personal author(s). Tullman JJ, Redding SW. *Systemic Disease in Dental Treatment*. St. Louis: The CV Mosby Company; 1983:1-5.
6. Chapter in a book. Rees TD. Dental management of the medically compromised patient. In: McDonald RE, Hurt WC, Gilmore HW, Middleton RA, eds. *Current Therapy in Dentistry*, vol. 7. St. Louis: The CV Mosby Company; 1980:3-7.
7. Agency publication. Miller AJ, Brunelle JA, Carlos JP, Brown LJ, Loe H. Oral Health of United States Adults. Bethesda, MD: National Institute of Dental Research; 1987. NIH publication no. 87-2868.
8. Dissertation or thesis. Teerakapong A. Langerhans' cells in human periodontally healthy and diseased gingiva. [Thesis]. Houston, TX: University of Texas; 1987. 92 p.

Electronic Citations

9. Online journals without volume and page information. Berlin JA, Antman EM. Advantages and limitations of meta-analytic regressions of clinical trials data. *Online J Curr Clin Trials* [serial online]. June 4, 1994; doc 134. Accessed July 20, 2000.
10. Online journals with volume and page information. Fowler EB, Breault LG. Ridge augmentation with a folded acellular dermal matrix allograft: A case report. *J Contemp Dent Pract* [serial online]. 2001;2(3):31-40. Available from: Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH. Accessed December 15, 2001.
11. Web sites. Centers for Disease Control and Prevention. Preventing emerging infectious diseases: Addressing the problem of antimicrobial resistance. Available at: <http://www.cdc.gov/ncidod/emergplan/antiresist/>. Accessed November 5, 2001.

TABLES

Tables should be numbered consecutively in Arabic numbers in the order of their appearance in the text. A brief descriptive title should be supplied for each. Explanations, including abbreviations, should be listed as footnotes, not in the heading. Every column should have a heading. Statistical measures of variations such as standard deviation or standard error of the mean should be included as appropriate in the footnotes. Do not use internal horizontal or vertical rules.

FIGURE LEGENDS

Legends should be typed double-spaced with Arabic numbers corresponding to the figure. When arrows, symbols, numbers, or letters are used, explain each clearly in the legend; also explain internal scale, original magnification, and method of staining as appropriate. Panel labels should be in capital letters. Legends should not appear on the same page as the actual figures.

FIGURES

Digital files must be submitted for all figures. Submit one file per figure. Multiple panels should be labeled and combined in a single file. Photomicrographs should have internal scale markings. Human subjects must not be identifiable in photographs, unless written permission is obtained and accompanies the photograph. Lettering, arrows, or other identifying symbols should be large enough to permit reduction and must be embedded in the figure file. Figure file names must include the figure number. Clinical color photographs are encouraged. There is no charge to the author for publication of any figure. Authors are asked to use shades of green, blue, or purple in color graphs. Yellow, red, and orange should be avoided unless scientifically necessary (e.g., to depict species of the orange complex, red complex, etc.). Authors are strongly encouraged to prepare basic, simple designs that can be clearly understood when reproduced; use of “3-dimensional” graphics is not recommended. Unnecessarily complex designs may be returned for simplification before publication. Details of programs used to prepare digital images must be given to facilitate use of the electronic image. Use solid or shaded tones for graphs and charts. Patterns other than diagonal lines may not reproduce well.

DIGITAL FILE SPECIFICATIONS

To ensure the highest quality reproduction of your figures, please observe the following recommendations.

Resolution

Proper resolution is very important to preserve the quality of your printed figures. The following resolutions must be submitted for your files. Please do not reduce your figures below a readable size to achieve higher resolution. These files will not be usable.

Format

TIFF or EPS files at the proper resolution (see above) will give the best results. If you cannot produce these files, do not send low-resolution conversions. With all figures, please also send a PDF that can be rasterized in the event your files are not usable. Word, Excel, PS, and JPEG files can sometimes be acceptable alternatives. Send these along with a PDF if you cannot achieve the proper results in TIFF or EPS format. For graphs and charts, do not use patterned fills. Solid tones or colors are recommended instead. Color Space Figures should be saved as CMYK, not RGB. Files submitted in RGB will be converted to CMYK, and significant color shift may occur.

Font

Files other than TIFF or JPEG must be saved with fonts embedded. Acceptable fonts include Helvetica, Times New Roman, Symbol, Mathematical PI, and European PI. All other fonts may be replaced, resulting in data loss or realignment.

Other

Please send a PDF with all figure submissions and verify that the PDF and digital versions of your figures are identical. If you have any questions concerning the creation or submission of digital art, please visit the Dartmouth Journal Services Web site at <http://www.dartmouthjournals.com/digart.html> or send an e mail to perio@dartmouthjournals.com.

UNITS OF MEASUREMENT

Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressure in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Description of teeth should use the American Dental Association (i.e., Universal/National) numbering system.

STATISTICS

Statistical methods should be described such that a knowledgeable reader with access to the original data could verify the results. Wherever possible, results should be quantified and appropriate indicators of measurement error or uncertainty given. Sole reliance on statistical hypothesis testing or normalization of data should be avoided. Data in as close to the original form as reasonable should be presented. Details about eligibility criteria for subjects, randomization, methods for blinding of observations, treatment complications, and numbers of observations should be included. Losses to observations, such as dropouts from a clinical trial, should be indicated. General-use computer programs should be listed. Statistical terms, abbreviations, and symbols should be defined. Detailed statistical, analytical procedures can be included as an appendix to the paper IF appropriate.

ANIMAL AND HUMAN TRIALS

All manuscripts reporting the use of human subjects must include a statement that the protocol was approved by the author's institutional review committee for human subjects AND that the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. Do not use any designation in tables, figures, or photographs that would identify a patient, unless express written consent from the patient is submitted. For research involving the use of animals, it is necessary to indicate that the protocol was approved by the author's institutional experimentation committee or was in accordance with guidelines approved by the Council of the American Psychological Society (1980) for the use of animal experiments.

FOOTNOTES

Footnotes should be used only to identify author affiliation; to explain symbols in tables and illustrations; and to identify manufacturers of equipment, medications, materials, and devices. Use the following symbols in the sequence shown: *, †, ‡, §, k, ¶, #, **, ††, etc.

IDENTIFICATION OF PRODUCTS

Use of brand names within the title or text is not acceptable, unless essential when the paper is comparing two or more products. When identification of a product is needed or helpful to explain the procedure or trial being discussed, a generic term should be used and the brand name, manufacturer, and location (city/state/country) cited as a footnote.

REVIEW PROCESS AND PUBLICATION PROCEDURES

Peer Review

The Journal of Periodontology is a peer-reviewed publication. All manuscripts, including State of the Art Reviews, Commentaries, Case Reports, Case Series, and Clinical Practice, are submitted to a minimum of two reviewers and, when appropriate, to a statistical reviewer. Authors are given reviewer comments and additional information or observations as the Editor believes would be helpful. Revised manuscripts are due within 30 days of receipt of the Editor's communication.

Copyright

All manuscripts accepted for publication become the property of the American Academy of Periodontology. A copyright form must be signed by all authors and returned to the Managing Editor. A file containing this form always accompanies the acceptance e-mail.

Reprints

Corresponding authors may purchase reprints at the time pages are received for proofreading. Reprints can be purchased in 4-color or black and white.

Web Uploading Policies and Instructions

The following information will help in preparing and submitting your manuscript to the Journal of Periodontology Web-based peer review system, Scholar- One Manuscripts. Also refer to the previous pages for guidelines on preparing and formatting manuscripts. Submit manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>. You will be able to monitor the progress of your manuscript through the peer review process.

PREPARING AND FORMATTING ELECTRONIC MANUSCRIPTS

Text file: Submission of manuscripts must be in Microsoft Word (.doc). This applies to both Windows and Macintosh platforms. If you are using any other Word processing program, you must save the text file as .rtf. Use basic fonts such as Arial, Courier, Times, or Times New Roman. Special or mathematical characters and Greek letters that are not on a standard keyboard must be created using the Symbol font.

Tables: The system will easily read tables created with Word's table utility or when inserted into Word from Excel.

Equations: Create an equation as text, treating any mathematical symbols as special characters and assigning them the Symbol font.

Figures and illustrations: To prevent problems during the review process, figures and illustrations should be submitted only in the following formats: EPS or TIFF, and at the highest resolution possible (at least 600 dpi for RGB or halftones [grayscale mode] and 1,000 dpi for line art [bitmap mode]). Any other format might not be readable by a reviewer. Illustrations and graphics for revised manuscripts should be submitted in EPS or TIFF only. Submit only one file per figure (combine and label panels). If panels are in different formats, save the entire file at the highest applicable resolution (see page 6). Save figures and illustrations with clear and simple file names, such as "Figure 1.tif" or "Fig1.tif." File names should match the labeling that appears in the legends in the text document.

SUBMITTING

For user account information, log on to ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>. Here, you will be able to either create an account or enter an existing account. If you believe you may already have an account, enter your e-mail address in the Password Help box on the right-hand side of the page. If the address you entered is found in the account records, an e-mail will be sent to you at that address containing your User ID and a temporary password. If you do not have an account in the system, click "Create Account" in the upper right-hand corner. Please fill in all fields accurately. All fields with "req" are required. If a required field does not apply to you, enter "none" or "N/A" in the space provided. When you are finished with a screen, click "Next" to continue to the next screen. When you reach the final screen and all information is entered, click "Finish" to submit your information. **Author Center:** To start the submission process, GO to the Author Center and click "Click here to submit a new manuscript." The following are explanations of the 7 steps required to submit a manuscript:

Screen 1 – Type, Title, & Abstract. Select a manuscript type from the pull-down menu. Enter the title, running head, and abstract for your manuscript in the appropriate boxes. You can either copy-and-paste your information from your manuscript text file into the box or type it directly into the box. Use the "Special Characters" button for special characters such as Greek letters and mathematical symbols or for formatting such as italics, boldface, or superscript. For example, when you click on the lowercase alpha, the appropriate code for the character appears where your cursor was placed on the previous screen. You can also use the "Preview" button to make sure all the codes are placed in the correct locations. If you are submitting a manuscript that does not require an abstract, please type "N/A" in the abstract box.

Under “Scope of Practice” and “Study Type,” please select the categories that describe your paper from the drop-down menus. If you select “other” under “Scope of Practice,” please include a description in the box provided. Click “Next” when you are finished with this screen.

Screen 2 – Attributes. Select a minimum of three or a maximum of 15 key words from the box. Highlight the key word you wish to include and click the “+ Add” button. These words are used in the review process and should not be included in your manuscript file. A maximum of six key words or short phrases, drawn from MeSH documentation, should be included in your manuscript file. Click “Next” when you are finished with this screen or “Previous” to return to the previous screen.

Screen 3 – Authors & Institutions. Your name and institution should be completed and located at the top of the page. Click “Edit” if you need to make any changes to your information. Once your information is correct, you may add co-authors to the paper. All authors should be listed here. Fill in the information under “Add a New Author” for each coauthor. After typing in an e-mail address, you may search to see if that person’s information is already in the database by clicking “Find.” If an e-mail is matched, the information for that author will be displayed. You may make any necessary changes to the institutional information and click “Add to My Authors” to add this author to your paper. If an incorrect author is found, click the “Clear” button to search again. If a match is not found, fill in the required information and click “Add to My Authors.” If a specific author has more than one affiliation, follow the link at the bottom of the “Add a New Author” box to add more affiliations. You must click the “+ Add” button for each affiliation. Make sure to click the “Save” checkmark before closing the “Add More Affiliations” screen. Once all authors have been added to the manuscript, click “Next” to proceed to the next screen or “Previous” to return to the previous screen. Please note that once the Journal of Periodontology has received a manuscript, any changes in authorship must be faxed to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Bethanne Wilson, Editorial Coordinator) and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper. Authors who are added must submit a conflict of interest and financial disclosure form.

Screen 4 – Reviewers. This step requests you to identify preferred or non-preferred reviewers but is not a mandatory part of the submission process. Fill in the required information and select “Designate as Preferred Reviewer” or “Designate as Non-Preferred Reviewer” as applicable. Once you have entered all information about reviewers, click “Next” to proceed to the next screen or “Previous” to return to the previous screen.

Screen 5 – Details and Comments. In the Box provided, you should either copy-and-paste your cover letter/comments or type them directly into the field. Also, you can upload your cover letter/ comments by clicking the “Browse” button and selecting a file on your computer. Click the “Attach this Cover Letter” button to attach it to your manuscript. You may also upload your conflict of interest and financial disclosure forms here. Do not attach any files from your manuscript itself in this section. In the boxes provided, fill in the total number of figures and tables. If there are no figures or tables in your manuscript, please enter “0” in the appropriate box. Your word count should also be entered in this area. If your manuscript is a study reporting a randomized controlled trial, there will be a link here to download the CONSORT checklist. Please save this to your computer. Using Adobe Reader, fill in the required information and save the file. Upload your completed form in the box provided. If you do not have Adobe Reader, you may download it for free at <http://get.adobe.com/reader/>. Be sure to read the submission statement and select “yes” from the pull-down menu. The Journal of Periodontology also requires the signatures of all authors on the conflict of interest and financial disclosure form as part of the submission process. If these forms were not uploaded in the previous cover letter area, they may be e-mailed to bethanne@perio.org or faxed to the editorial Office at 312/573-3225 (attn: Bethanne Wilson, Editorial Coordinator). You must check the box next to this explanation to acknowledge that you have read it and will provide conflict of interest and financial disclosure forms for each author. This form can be found on ScholarOne Manuscripts (<http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>) in the upper righthand corner under “Instructions & Forms.” Click “Next” to proceed to the next screen or “Previous” to return to the previous screen.

Screen 6 – File Upload. When you upload your manuscript in Microsoft Word format (.doc), the file will automatically be converted to both .PDF and HTML formats. Any figure or illustration will also be converted to .PDF and HTML. A .PDF and HTML proof will be created, combining your document and images. Follow steps 1 through 4 to upload your manuscript files:

1. Browse to find the desired file.
2. Select the file designation: image file (includes color and grayscale figures; color and black & white line art); main document (includes title page, abstract, key words, text, footnotes, acknowledgments, references, figure legends, and tables); or supplemental file (multimedia or other necessary documents).
3. You may upload as many as 5 files at a time. Repeat steps 1 and 2 for each file.
4. Click "Upload Files." You will see a "file details" window for each file that you have uploaded. On this screen, you are able to write a file tag or caption (if it is an image). Please note that if you have uploaded an image in EPS, TIFF, or JPEG format, it is recommended to place "Fig. 1, Fig. 2," etc. in the captions area for ease of viewing. Once you have done this, click "Save." You will be brought back to the File Upload (Screen 6), where you can continue uploading files. When you have no additional files to upload, click "Next" to proceed to the final screen or "Previous" to return to the previous screen.

Screen 7 – Review & Submit. Please verify that all screens have been completed (a green checkmark will appear if all required information is completed). You must also preview your .PDF proof before submitting your manuscript. Click the .PDF button at the bottom of the page (Screen 7) to preview your manuscript. An option to preview your submission in HTML is also available, but not required. After you have confirmed that all information is correct and have previewed your .PDF proof, click "Submit." Confirmation of your submission will be noted. Print your manuscript ID number. Please include this number on any correspondence you send to the editorial office. If for any reason you exit the system before completing any screen, you can continue where you left off by logging in, going to the Author Center, and clicking the "Continue Submission" button under "Unsubmitted Manuscripts."

FINALIZING SUBMISSION

If you did not upload a conflict of interest and financial disclosure form for each author during the online submission process, please fax these forms to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Bethanne Wilson, Editorial Coordinator).

CHECKING THE STATUS OF YOUR MANUSCRIPT

You can return to your Author Center at any time to check the status of your manuscript (click "Submitted Manuscripts"). Once a decision has been made, you will be notified by e-mail. No hard copy letters will be mailed.

SUBMITTING REVISED MANUSCRIPTS

To submit a revised paper, log on to ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>. Select Author Center, then "Manuscripts with Decisions." Under the Actions column, click "create a revision" to begin your revision. The manuscript will now be moved to the "Revised Manuscripts in Draft" queue. Once you have begun your revision, you will be prompted through the following screens:

Screen 1 – View and Respond to Decision Letter. Here you will be able to view the decision letter and comments from the reviewers. In the box below, please place a detailed response to each reviewer comment for the original manuscript. Your response to reviewers should also describe what changes were made in the manuscript to address each comment in the reviews.

Screens 2 – 5 – Please see the above explanations under "Submitting."

Screen 6 – Please upload your revised manuscript files. All files uploaded with your original submission will be included on this screen. Include only the latest set of files. If you have updated a file, please delete the original version and upload the revised file. Please note that even if your figures have not been revised, they should be resubmitted with your revised manuscript.

Screen 7 – Please confirm that all information is correct and that you have previewed your .PDF proof before submitting. Once you have submitted your revised manuscript, you will receive a confirmation e-mail message from the system when your revised paper has been successfully uploaded and received in the editorial office.

MANUSCRIPTS ACCEPTED FOR PUBLICATION

If your manuscript is accepted for publication, all authors must complete a copyright form, which can be found at <http://mc.manuscriptcentral.com/jperio> under “Instructions & Forms” in the upper right-hand corner of the screen. A file containing this form also accompanies the acceptance e-mail. Please fax this form to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Bethanne Wilson, Editorial Coordinator). You will be notified about a publication date by the Managing Editor.

Anexo C

Ilustração do Procedimento Cirúrgico

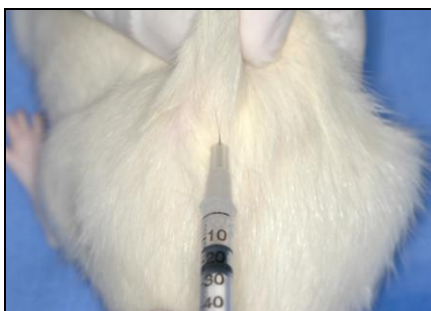


Figura 1. Aplicação da nicotina ou solução fisiológica no dorso da rato.

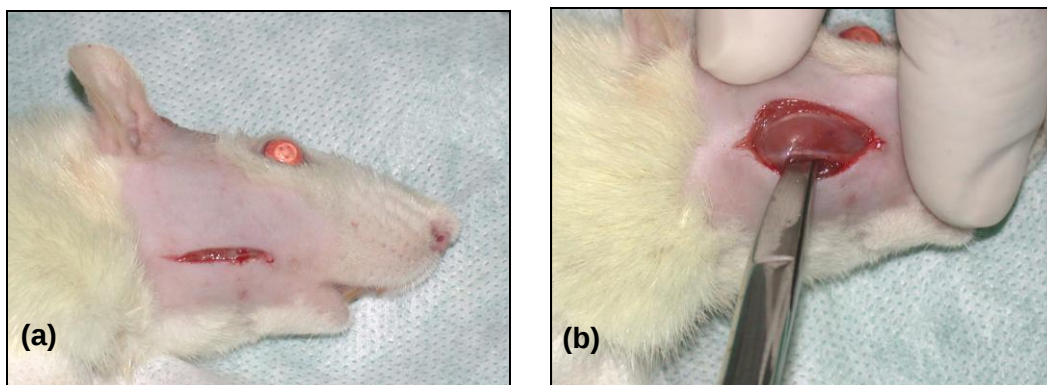


Figura 2. Preparo do leito receptor. **a)** incisão linear na região de ângulo da mandíbula expondo o músculo masseter; **b)** divulsão do músculo masseter com tesoura de ponta romba.

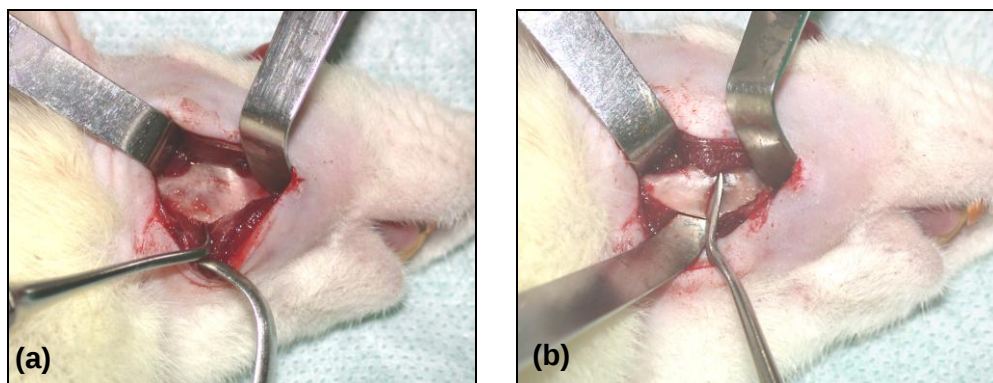


Figura 3. Preparo do leito receptor. **a)** deslocamento do periósteo do lado medial da mandíbula juntamente com o músculo pterigóideo medial, com auxílio de um Hollenback nº.3s; **b)** raspagem superficial do leito receptor para remoção do periósteo.



Figura 4. Afastadores especialmente desenvolvidos para adequada visualização e acesso ao leito receptor da mandíbula.

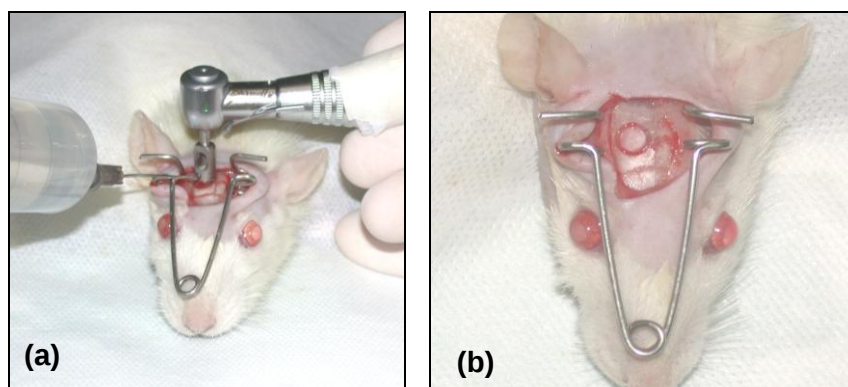


Figura 5. Área doadora. a) remoção do enxerto da região parietal direita com trefina; cirúrgica, sob irrigação com solução fisiológica. b) bloco ósseo removido em toda espessura da cúpula.

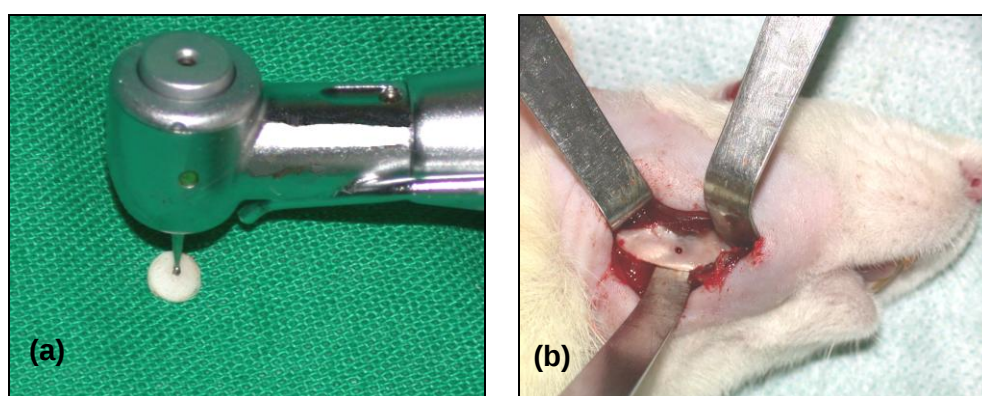


Figura 6. Enxerto ósseo. a) broca¹ posicionada no centro do enxerto ósseo para perfuração; b) perfuração do leito receptor da mandíbula com broca¹.

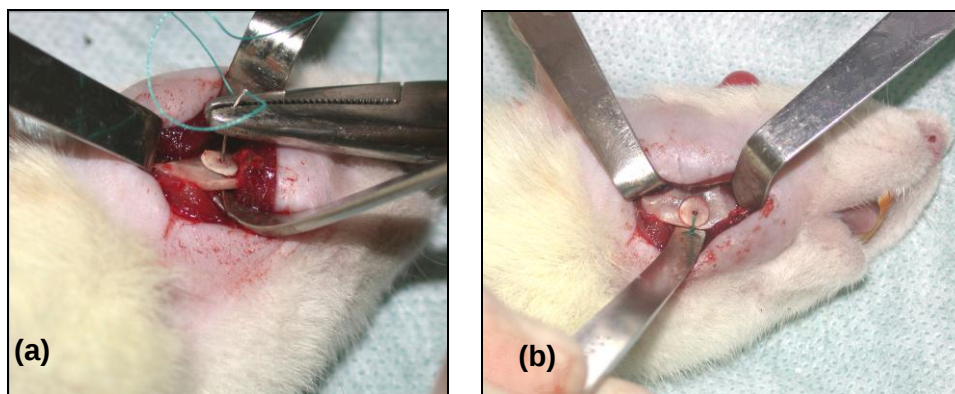


Figura 7. Fixação do enxerto. **a)** fio de poliéster verde trançado nº.5-0 transpassando o enxerto ósseo e o leito receptor da mandíbula. **b)** Enxerto suturado e estabilizado.

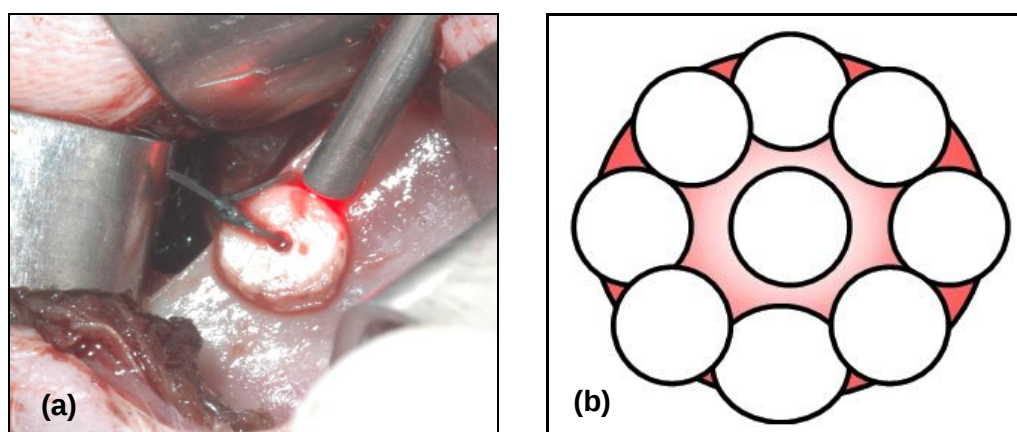


Figura 8.a) irradiação do laser em baixa intensidade na interface enxerto-leito receptor; **b)** esquema do enxerto ósseo com a perfuração no centro e irradiação laser nos 8 pontos eqüidistantes.



Figura 9. Aparelho de laser.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)