



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PERIODONTIA**

RITA DE CASSIA PUCCI DA SILVA

**INFLUÊNCIA DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE O
REPARO ÓSSEO EM ANIMAIS EXPOSTOS À NICOTINA**

Curitiba

2016

RITA DE CASSIA PUCCI DA SILVA

**INFLUÊNCIA DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE
SOBRE O REPARO ÓSSEO EM ANIMAIS EXPOSTOS À
NICOTINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Sônia Mara Luczyszyn.

**Curitiba
2016**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Giovanna Carolina Massaneiro dos Santos – CRB 9/1911

S586i
2016
Silva, Rita de Cassia Pucci da
Influência do laser de baixa intensidade sobre o reparo ósseo em animais
expostos à nicotina / Rita de Cassia Pucci da Silva; orientadora: Sonia Mara
Luczyszyn . – 2016.
89 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2016
Inclui bibliografias.

1. Periodontia. 2. Lasers em odontologia. 3. Remodelação óssea.
4. Nicotina. 5. Animais - Experimentação. I. Luczyszyn, Sonia Mara.
II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em
Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.632


TERMO DE APROVAÇÃO


RITA DE CASSIA PUCCI DA SILVA

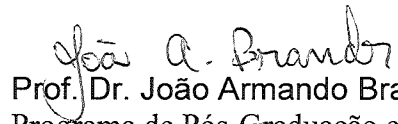
A INFLUÊNCIA DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE O REPARO ÓSSEO EM ANIMAIS EXPOSTOS À NICOTINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Mestre em Odontologia**, Área de Concentração em **Periodontia**.

Orientador(a):


Prof.ª Dr.ª Sônia Mara Luczyszyn
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Rui Fernando Mazur
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. João Armando Brancher
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UP

Curitiba, 21 de julho de 2016.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Sônia Mara Luczyszyn, orientadora dessa dissertação, pelo apoio, atenção e ajuda durante todas as etapas do projeto.

Aos colegas de curso Gustavo Bento e Laura Tozzo pelo apoio e companherismo durante todo o curso e durante as etapas cirúrgicas do projeto.

Ao técnico Misael Aparecido do Laboratório de Técnica Operatórias da PUCPR pela ajuda e atenção prestada durante o período de cirúrgias nos animais.

Ao técnico Thiago Gomes, do laboratório LAMIR/UFPR por todo o suporte e atenção durante a obtenção das microtomografias.

Aos técnicos do laboratório de Patologia Ana Paula Camargo Martins, Seigo Nagashia e Marina Azevedo por toda atenção e ajuda na obtenção das lâminas.

À Prof. Dra. Aline C. B. Rodrigues Johann pela atenção e ajuda durante a leitura das lâminas.

Ao Prof. Dr. Sérgio Aparecido Ignácio pela atenção e confecção da parte estatística do trabalho.

À minha mãe, Deizi Temis Pucci, por sempre me incentivar e me ajudar a finalizar o curso, principalmente nas fases finais, mesmo com a correria que minha vida virou.

Ao meu pai, Claudio Romeu da Silva Ramos, por sempre se orgulhar de mim, sempre me apoiar e me fazer querer ser a pessoa que ele sempre achou que eu fosse.

Ao meu noivo, Muriel Sergio Karpuchi, por estar sempre ao meu lado por toda esta etapa acadêmica, e ter orgulho de mim. Por me cobrar a organização que não tenho, mas mesmo assim me fazendo ser uma pessoa melhor. Amo você. E que venha o casamento!

Ao meu irmão, Romeu Cassiano Pucci da Silva Ramos, por se espelhar em mim, e sabendo ele ou não que terá chances de ser um profissional tão bom quanto eu.

Aos professores da área de concentração em Periodontia Prof. Dr. Sung Kim, Prof. Dra. Vula Papalexidou e Prof. Dr. Vinícius Tramontina pelos conhecimentos compartilhados ao longo do curso.

Ao PPGO, em especial aos coordenadores Prof. Dr. Sérgio Vieira e Prof. Dra. Renata Werneck, e também as secretárias Neide Borges e Flávia Beuting Pereira.

SUMÁRIO

Resumo.....	1
Introdução.....	2
Material e Método.....	3
Resultados	11
Discussão.....	13
Conclusão	16
Referências	17
ARTIGO EM INGLÊS.....	20
Title page.....	20
Abstract.....	21
Introduction.....	22
Materials and methods.....	23
Results.....	30
Discussion.....	32
References.....	36
ANEXOS.....	39
Material e Método completo.....	39
Análise estatística	56
Normas do International Journal Of Oral and Maxillofacial Surgery.....	75
Parecer de comitê de ética.....	89

Resumo

O objetivo desse estudo foi analisar a influência do laser de baixa intensidade (LBI) sobre o reparo ósseo em animais expostos ou não à nicotina. Foram utilizados 40 ratos divididos em 4 grupos: controle (C), laser (L), nicotina (N) e nicotina + laser (NL). Os animais receberam solução injetável contendo nicotina (grupos N e NL) ou solução salina (grupos C e L). As injeções foram aplicadas durante 8 semanas. Após os primeiros 28 dias, os primeiros molares inferiores do lado direito foram extraídos. Para os grupos L e NL, a aplicação do laser foi feita imediatamente após a exodontia e repetida 2 vezes por semana, por 14 dias. Passados mais 14 dias, os mesmos procedimentos foram realizados no lado esquerdo. Após 28 dias da primeira cirurgia, os animais foram eutanasiados. Os resultados mostraram que, na análise microtomográfica, o grupo N obteve menor porcentagem de formação óssea em relação aos outros grupos, tanto no período de 14, quanto no de 28 dias ($p < 0,05$). Já o grupo NL, independente do tempo, obteve porcentagem de formação óssea superior ao grupo N ($p < 0,05$). Na análise histomorfométrica, o grupo N, aos 14 dias, obteve uma menor porcentagem de formação óssea em comparação aos grupos C e NL ($p < 0,05$). O grupo NL apresentou uma maior porcentagem de formação óssea em relação ao grupo N, tanto aos 14, quanto aos 28 dias ($p < 0,05$). O grupo L apresentou maior porcentagem de formação óssea em comparação ao grupo C, no tempo de 14 dias ($p < 0,05$). Concluiu-se que a ação da nicotina interferiu sobre o reparo ósseo, o que foi evidenciado pela menor porcentagem de formação óssea nos alvéolos. No entanto, O Laser de baixa intensidade quando aplicado em alvéolos pós exodontia de ratos expostos à nicotina promoveu maior porcentagem de formação óssea.

Introdução

Muitos estudos clínicos e epidemiológicos indicam que os efeitos da nicotina prejudicam a resposta a procedimentos cirúrgicos e não cirúrgicos^{1,2,3}. Meechan *et al.*⁴ identificaram o tabaco como um dos fatores predisponentes principais para a ocorrência de dor após exodontias. Este estudo mostrou que o preenchimento do alvéolo por sangue no pós-operatório foi significativamente menor em fumantes e os autores sugeriram que esta constatação poderia também estar relacionada à maior sintomatologia pós-extração. O uso do tabaco pode acarretar efeitos prejudiciais na cicatrização de fraturas e defeitos ósseos assim como interferir nas funções osteoblásticas⁵. Estudo clínico com 15 pacientes mostrou que 80% dos indivíduos com deficiência na cicatrização óssea eram fumantes⁶. Além disso foi demonstrado que a nicotina promoveu inibição da proliferação dos fibroblastos, assim como diminuição da produção da matriz extracelular e aumento na atividade da enzima colagenase⁷. A nicotina é uma substância altamente viciante e estimulante do sistema nervoso central, sendo que a mesma pode causar vasoconstrição⁸ e, por consequente, provocar diminuição no fluxo sanguíneo e redução na tensão periférica de oxigênio^{5,9,10}, redução na revascularização e na osteogênese^{5,11}, atraso no reparo de alvéolos de dentes extraídos e na cicatrização de feridas^{12,13}. A nicotina produz efeitos prejudiciais importantes nos processos de vascularização, cicatrização e remodelação óssea^{5,11}.

O uso do laser de baixa intensidade (LBI) é bem conhecido na Odontologia por seu efeito antiinflamatório, analgésico e regenerativo¹⁴. O LBI estimula a síntese de colágeno e o fechamento de feridas¹⁵. Também promove reparo da pele, ligamentos, tendões, tecido ósseo e cartilagem em animais¹⁶. O LBI incita diferentes respostas biológicas que causam aumento do metabolismo celular e do potencial de regeneração, além de promover um efeito antiinflamatório com analgesia e vasodilatação¹⁷. Estudo realizado por Benedicenti¹⁸ concluiu que depois da aplicação do LBI, houve aumento nos níveis de beta-endorfina, que produziu efeito analgésico. O LBI também promove o rompimento da membrana do mastócito, aumenta a quantidade de histamina, provoca vasodilatação, aumenta a permeabilidade vascular e age sobre as prostaglandinas, inibindo e bloqueando a ação da enzima ciclooxigenase, promovendo efeito antiinflamatório¹⁹. O efeito bioestimulador do LBI foi observado pelo aumento dos fibroblastos, regeneração de vasos sanguíneos e aumento da epitelização. A aplicação do LBI nos tecidos gerou aumento no trifosfato de adenosina (ATP) intracelular resultando em aceleração das mitoses, fazendo com que a divisão celular fosse acelerada o que estimulou a nova formação de vasos, aumentando a capacidade de

cicatrização dos tecidos²⁰. Estudos *in vivo* sobre regeneração óssea mostraram aumento na deposição óssea após extrações dentárias onde os alvéolos receberam aplicação de LBI, sugerindo que o mesmo possa ter intensificado o processo de neoformação óssea^{1,21,22}.

Os mecanismos pelos quais a ação do LBI acontece ainda não são completamente compreendidos²³, mas até o momento, nenhum efeito adverso foi demonstrado, o que pode sugerir que a ação bioestimulatória do LBI atue como um fator coadjuvante altamente benéfico no reparo ósseo¹⁰. O presente estudo teve como objetivo analisar a influência do LBI sobre o reparo ósseo de alvéolos em animais expostos ou não à nicotina.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar por meio de análise microtomográfica e histomorfométrica a porcentagem de formação óssea em alvéolos pós-exodontia tratados com laser de baixa intensidade, em animais expostos ou não à nicotina.

Material e Método

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da PUCPR sob parecer número 879 (Anexo).

Foram utilizados 40 ratos machos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), provenientes do Biotério da PUC/PR, com idade de 120 dias e peso entre 280-320g.

Os animais foram armazenados em gaiolas plásticas com grade metálica com no máximo 3 animais em cada uma delas. Receberam dieta composta de ração e água *ad libitum*.

Foram utilizados 40 animais, porém durante o trabalho 4 deles foram perdidos. Os animais foram divididos em 4 grupos:

Grupo controle (C): 9 animais;

Grupo laser (L): 9 animais;

Grupo nicotina (N): 9 animais;

Grupo nicotina-laser (NL) : 9 animais.

Todos os animais dos grupos nicotina e nicotina-laser receberam solução de Hemissulfato de Nicotina (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) diluída em solução salina à concentração de 5mg/mL. Cada rato recebeu um volume de solução diluída calculada como

3 mg/kg/dia dividida em 2 aplicações (7h e 17h), pelo período de 4 semanas que antecederam os procedimentos cirúrgicos e continuaram por mais 4 semanas até o dia da eutanásia, totalizando 8 semanas de exposição à droga, de acordo com o protocolo proposto por Okamoto *et al.*²⁴.

Os animais dos grupos controle e laser receberam o mesmo volume de solução injetável, porém em forma de solução salina sem a nicotina diluída, seguindo o mesmo protocolo.

Para evitar hematomas e minimizar o estresse, as aplicações foram alternadas na região do dorso, ventre direito e ventre esquerdo dos animais. Para tal, foram utilizadas agulhas de insulina BD®ultrafine (Franklin Lakes, New Jersey, EUA).

TÉCNICA CIRÚRGICA

Os animais receberam inicialmente relaxante muscular e sedativo de uso animal Rompun (Bayer S.A. Leverskusen, Alemanha) na dosagem de 1,5 ml/kg. Foram submetidos à anestesia geral por meio de injeção intramuscular de Cloridrato de Ketamina (Ketalar injetável – Achè Laboratórios Farmacêuticos S.A., Ticino, Suíça) na dosagem de 75 mg/kg de massa corporal. Também receberam anestesia local infiltrativa com Lidocaína a 3%, contendo Norepinefrina 1:50.000 (DLA Pharmaceutical LTDA, Alcabideche, Portugal).

Para cirurgia, os ratos foram imobilizados em decúbito dorsal e posicionados sobre uma mesa operatória própria para a contenção e abertura da boca, mantida por meio de elásticos ancorados aos incisivos superiores e inferiores.

Após a anestesia local, utilizando lâmina de bisturi n°15 (Solidor, Osasco, SP, Brasil) foi realizada incisão intrasulcular no primeiro molar mandibular direito e em seguida, foi realizado o descolamento do tecido gengival com o uso de descoladores e periótomos (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil).

Para a luxação e extração do dente, foi usada espátula Hollembach número 6 (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil) com o movimento de alavanca entre o primeiro e segundo molar. Devido à dificuldade no momento da extração, em alguns casos, foi necessário o uso de pinças hemostáticas (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil) para remover o dente multirradicular. Após a exodontia, o tecido foi suturado com fio de Nylon 5.0 (Ethicon Johnson & Johnson®, New Brunswick, New Jersey, EUA.) Em seguida, uma única dose de 30000 UI de Penicilina-G Benzatina e de Paracetamol na concentração de 200mg/Kg foi administrada por via intramuscular.

Após 14 dias, os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos realizados anteriormente, porém do lado esquerdo. Todos passaram exatamente pelo mesmo tratamento executado do lado direito.

LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA

Para os grupos tratados com LBI, a aplicação foi feita imediatamente após a exodontia, diretamente no alvéolo (Fig. 1) e repetida duas vezes por semana com intervalo de um dia entre elas, durante duas semanas. O protocolo de aplicação seguiu as recomendações do fabricante como indicação à bioestimulação óssea (Whitening Lase II DMC, São Carlos, São Paulo, Brasil). A potência do laser é de 100mW e a dose aplicada foi de 3,3J utilizando a fluência de 120J/cm e o comprimento de onda de 808nm (laser infravermelho), pelo tempo de 33 segundos.

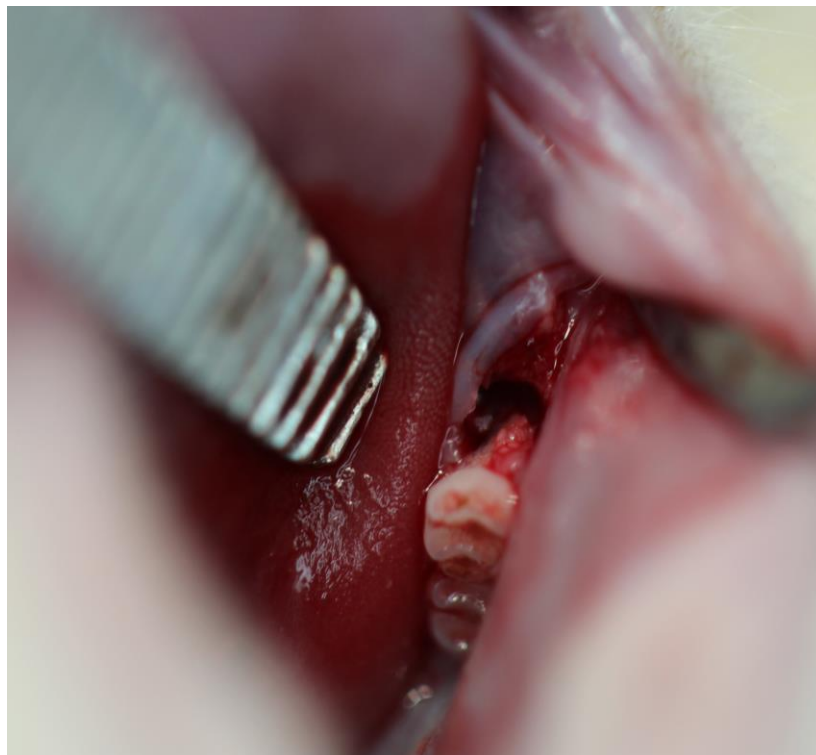


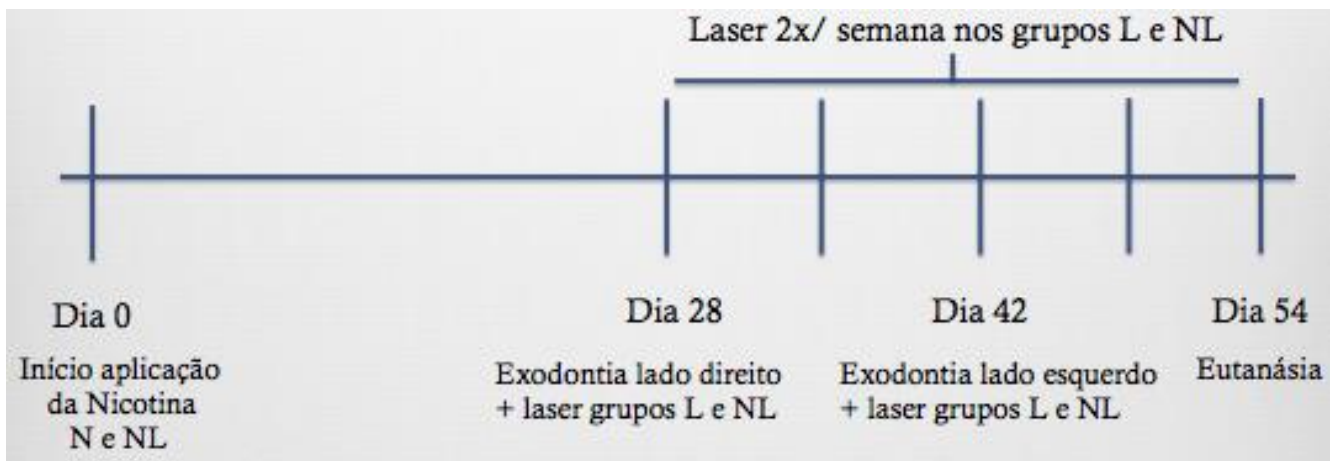
Fig. 1. Visualização do alvéolo pós-exodontia, região da aplicação do LBI.

EUTANÁSIA

Após 28 dias da primeira cirurgia, os animais foram mortos por meio de sobredosagem de Cloridrato de Ketamina (Ketalar injetável, Achè Laboratórios

Farmacêuticos S.A., Ticino, Suíça). As mandíbulas foram dissecadas, acondicionadas em frascos individuais, identificadas e fixadas em formol a 10%, regularizado para pH neutro por adição da solução tampão de fosfato (pH 7,2). Primeiramente, as peças foram submetidas à análise microtomográfica e posteriormente, foram processadas para análise histomorfométrica. Estas análises foram feitas por um examinador cego.

A metodologia obedeceu a seguinte sequência:



ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA

A análise microtomográfica foi realizada no Laboratório de Análise de Minerais e Rochas (LAMIR, UFPR), com a utilização do Microtomógrafo SkyScan (Bruker, modelo 1172, 2010, Kontich, Bélgica).

Cada amostra foi posicionada sobre um suporte e analisada separadamente. A voltagem da fonte foi de 89 KV e a corrente de 112 mA, com o tempo de exposição de 270 milissegundos por secção, com média de tempo total de 11 minutos para varredura de cada amostra, sendo que esta foi feita sem filtro. O tamanho de pixels usado foi de 9.02 micrometros e cada secção tomográfica teve dimensões de 1336x2000 pixels.

As imagens foram capturadas com auxílio do software NRECON v1.6.10. (Bruker, Kontich, Bélgica), no qual foi feita a reconstrução da imagem em secções transversais. Todas as imagens foram ajustadas visualmente considerando brilho e contraste para padronização da cor. Com o auxílio do software CT Analyser Version: 1.9.1.0.© 2003-08 SkyScan, foi possível separar um lado da mandíbula do outro para obtenção dos resultados separadamente. Após esta separação foi utilizado o software DATAViewer v1.5.2. (Bruker, Kontich, Bélgica) para a obtenção do corte sagital de cada amostra. Posteriormente a imagem sagital foi analisada no software CT Analyser v1.9.1.0.© 2003-08 SkyScan, (Bruker, Kontich, Bélgica), o qual possibilitou a realização da análise quantitativa.

A região do alvéolo da raiz distal, definida pelo espaço compreendido entre as duas cristas ósseas proximais foi delimitada nas secções tomográficas sagitais para serem convertidas em escala de tons de cinza. Pelo processo de binarização (Figs. 2 e 3) foi possível separar fases de densidade diferentes (o número de tons de cinza distinguíveis possíveis vão de 0 a 255). As binarizações em tons de cinza se deram por comparação visual direta das imagens das secções tomográficas com a escala de intensidades de cinza do software. Para a imagem radiopaca (sugerindo tecido ósseo) foi utilizado o intervalo de tons de cinza da ordem de 61 até 255. O restante do intervalo de tons de cinza, de 0 a 60, foi caracterizado pela soma de imagens com radiopacidade menor à óssea (sugerindo tecido mole e espaço vazio).

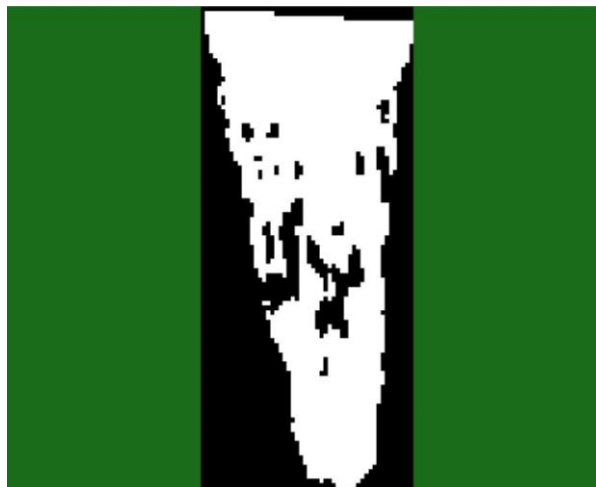


Fig 2. Parte branca representa, na escala de cinza, o intervalo de 0-60 (sugere o espaço vazio ou tecido mole).



Fig 3. Parte branca representa, na escala de cinza, o intervalo de 61-255 (sugere a formação óssea).

ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Para a análise histomorfométrica, as peças foram submetidas à descalcificação em líquido de Morse (ácido fórmico à 50% + Citrato de Sódio à 10%, 1:1), por um período de sessenta dias. Em seguida, foram incluídas em parafina (Histosec, L.C.T, S. L, Lardero, Espanha) sendo orientadas para obtenção de cortes histológicos no sentido méso-distal. Cortes semi-seriados de 5 µm de espessura foram obtidos e corados com Sirius Red.

As lâminas coradas em Sirius Red foram scaneadas no scanner Axio Scan. Z1 (Zeiss, Alemanha)(Fig. 4) na magnificação 2,5x. Uma área de aproximadamente 492189 µm² foi analisada. A porção de colágeno (tecido mole) das imagens foi removida com o auxílio do software Photoshop CS6 (Adobe, San Jose, CA, USA) (Fig. 5). As imagens finais foram abertas no software Image Pro Plus 4 (Media Cybernetics, INC. Rockville, MD, EUA). A região do alvéolo da raiz distal, definida pelo espaço compreendido entre as duas cristas ósseas proximais foi delimitada, seguindo a metodologia preconizada por Giorgetti *et al.*²⁵. Este procedimento foi realizado em dois momentos com intervalo de 20 dias entre eles afim de calibrar o examinador. Por meio de uma máscara especialmente confeccionada para esta leitura, os tons correspondentes ao tecido ósseo e espaço vazio foram identificados, usando a técnica de demarcação do novo osso formado desenvolvida por Barushka *et al.*²⁶(Fig. 6). Desta forma, foi obtida a porcentagem de tecido ósseo formado dentro do espaço demarcado do alvéolo.

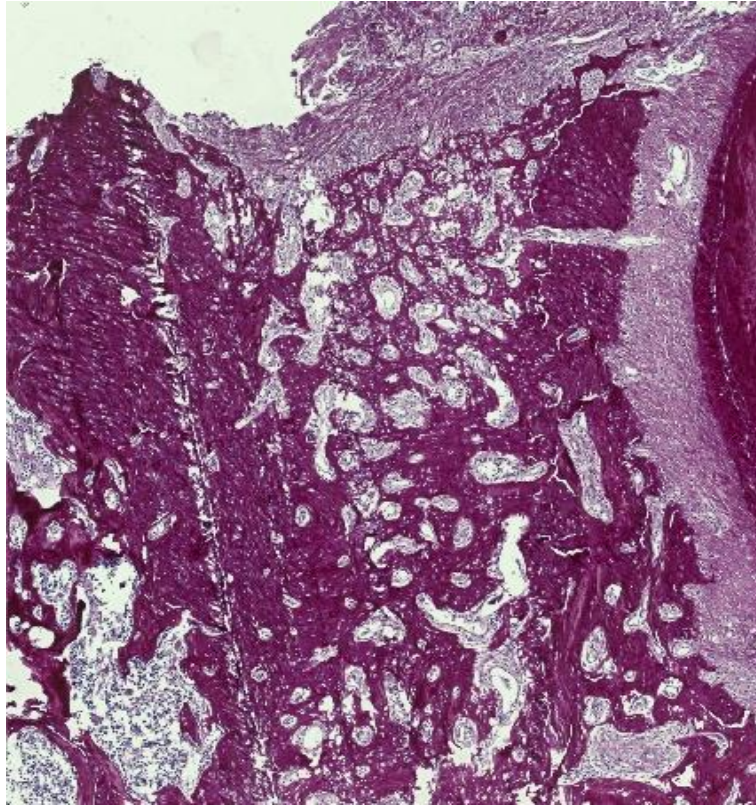


Fig 4. Lâmina Scaneada (Sirius Red 2,5x).

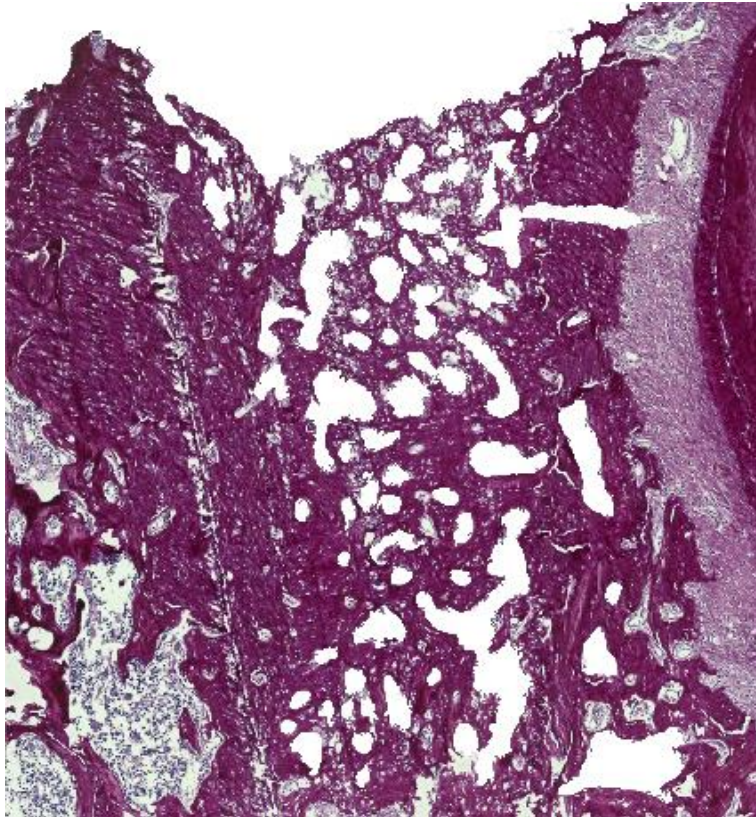


Fig 5. Remoção do tecido conjuntivo pelo software Photoshop CS6 (Sirius Red 2,5x).

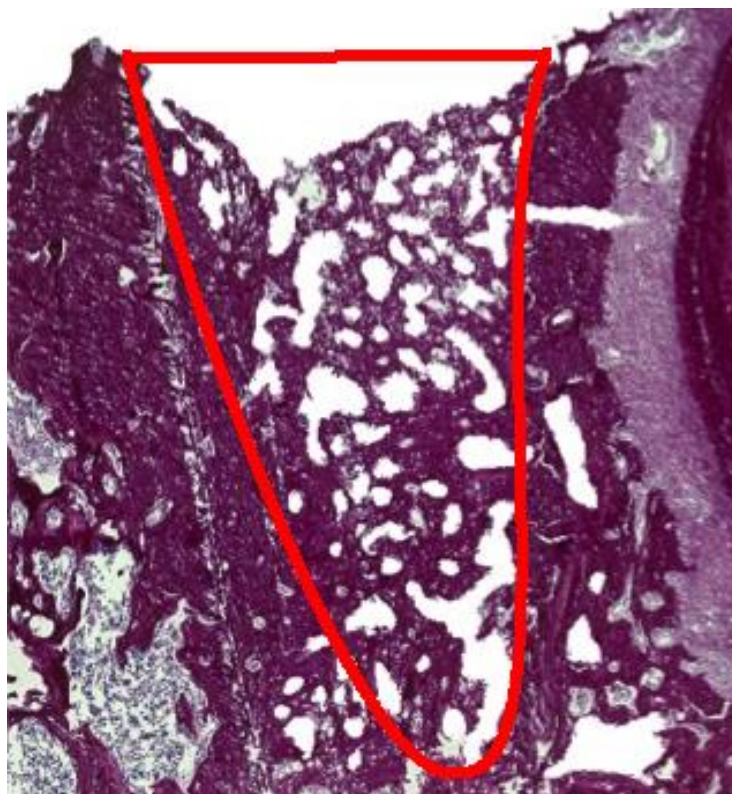


Fig 6. Delimitação do alvéolo com o auxílio do software Image Pro Plus 4 (Sirius Red 2,5x).

ANALISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada usando o programa SPSS (versão 16.0; IBM-SPSS, Armonk, NY). O Nível de significância adotado foi de 0,05. Visando comparar se existia diferença nos valores médios da porcentagem de formação óssea, considerando-se grupo e tempo, testou-se inicialmente a normalidade dos dados através do teste de normalidade de Kolmogorov Smirnov. Testou-se ainda, a homogeneidade de variâncias entre grupo e tempo por meio do teste de homogeneidade de variâncias de Levene. A comparação dos valores médios da porcentagem de formação óssea segundo grupo e tempo foi feita utilizando o método Anova a dois critérios, modelo fatorial completo. Quando Anova indicou diferenças entre grupo e entre grupo e tempo, as comparações múltiplas dois a dois foram feitas utilizando o teste de comparações múltiplas paramétricas de Tukey, que foi o que aconteceu para a variável porcentagem de formação óssea avaliada na microtomografia, uma vez que o teste de Levene indicou variâncias homogêneas entre grupo e tempo. Foi aplicado o teste de Games-Howell para variâncias heterogêneas para a variável porcentagem de formação óssea avaliada histomorfometricamente, uma vez que o teste de homogeneidade de Levene indicou variâncias heterogêneas entre grupo e tempo.

Resultados

ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA

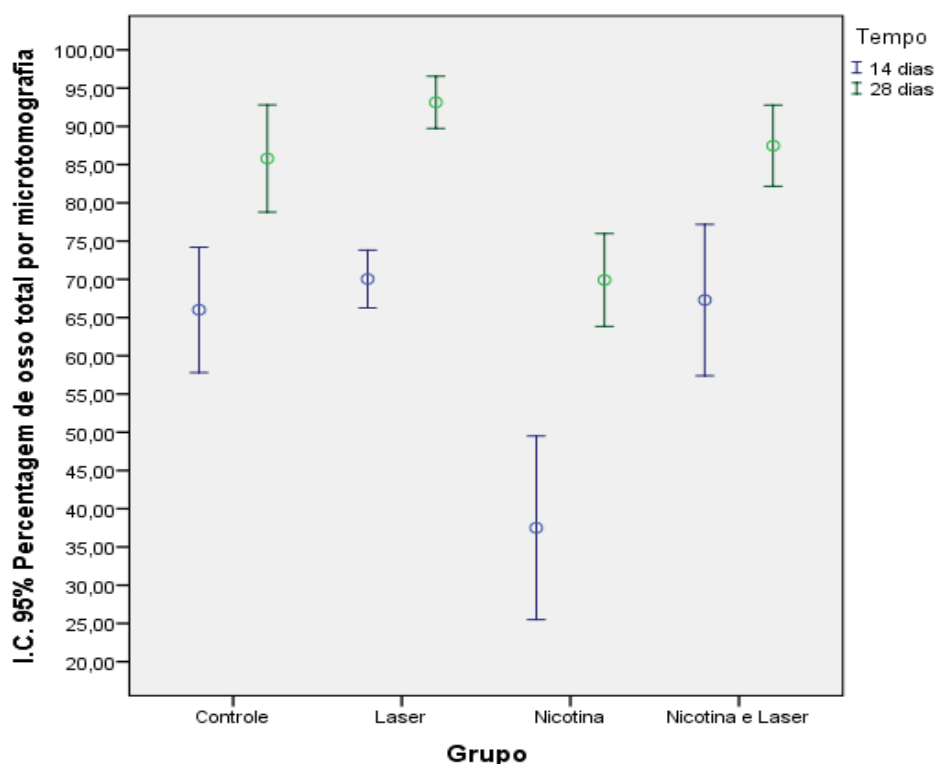
Nas imagens obtidas pela análise microtomográfica foi possível observar que o grupo nicotina mostrou menor porcentagem de formação óssea em relação aos outros grupos, tanto no período de 14 quanto de 28 dias ($p < 0,05$). Já o grupo NL, independente do tempo, obteve porcentagem de formação óssea superior ao grupo N ($p < 0,05$).

14 DIAS	CONTROLE (N=8)	LASER (N=7)	NICOTINA (N=6)	NICOTINA/ LASER (N=8)	VALOR p
% DE FORMAÇÃO ÓSSEA/ MICROTOMOGRAFIA (Média ± dp)	66.01±9.8	70.04±4.09	37.50±11.44	67.29±9.43	p<0,05

Tabela 1. Teste de Tukey ($p < 0,05$)

28 DIAS	CONTROLE (N=6)	LASER (N=7)	NICOTINA (N=8)	NICOTINA/ LASER (N=9)	VALOR p
% DE FORMAÇÃO ÓSSEA/ MICROTOMOGRAFIA (Média ± dp)	85.79±6.68	93.14±3.68	69.91±7.27	87.47±6.91	p<0,05

Tabela 2. Teste de Tukey ($p < 0,05$)



ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

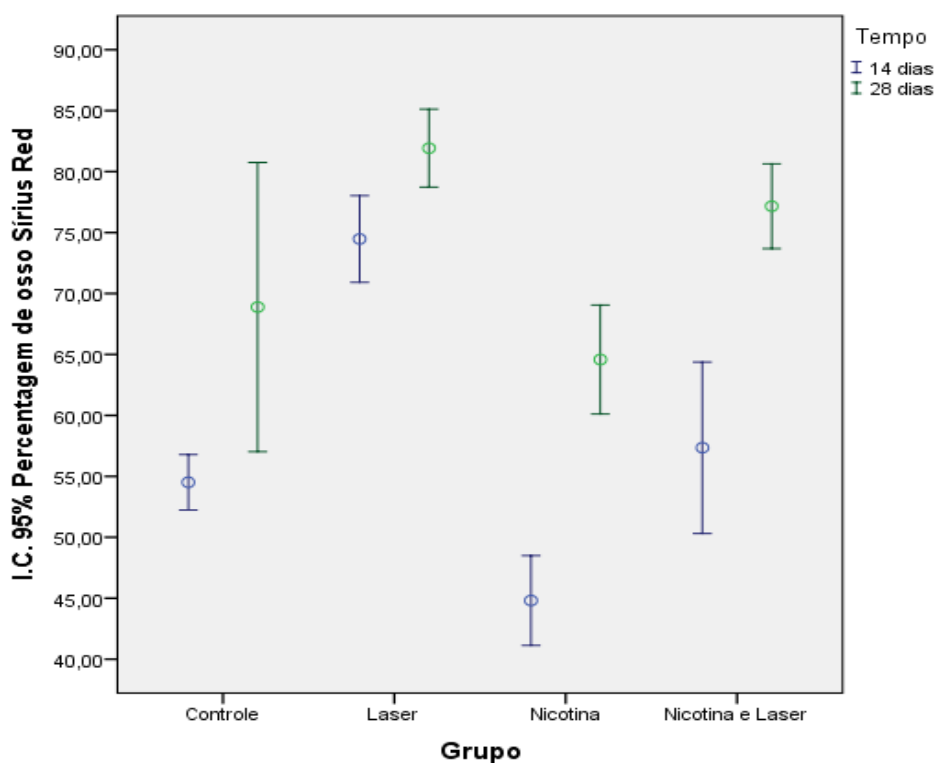
Os resultados mostraram, na análise histomorfométrica, que o grupo N, aos 14 dias, obteve menor porcentagem de formação óssea em comparação aos grupos C e NL ($p < 0,05$). O grupo NL apresentou maior porcentagem de formação óssea em relação ao grupo N, tanto aos 14, quanto aos 28 dias ($p < 0,05$). O grupo L apresentou maior na porcentagem de formação óssea em comparação ao grupo C, no tempo de 14 dias ($p < 0,05$).

14 DIAS	CONTROLE (N=8)	LASER (N=7)	NICOTINA (N=6)	NICOTINA/ LASER (N=8)	VALOR p
% DE FORMAÇÃO ÓSSEA/HISTOMORFOMÉTRICO (Média ± dp)	54.51±2.72	74.48±3.84	44.81±3.51	57.35±6.70	p<0,05

Tabela 3. Teste de Games-Howell ($p < 0,05$)

28 DIAS	CONTROLE (N=6)	LASER (N=7)	NICOTINA (N=8)	NICOTINA/ LASER (N=9)	VALOR p
% DE FORMAÇÃO ÓSSEA/HISTOMORFOMÉTRICO (Média ± dp)	68.89±11.30	81.92±3.46	64.58±5.34	77.16±4.52	p<0,05

Tabela 4. Teste de Games-Howell ($p < 0,05$)



Discussão

Um dos efeitos marcantes da ação da nicotina é a vasoconstrição, a qual pode predispor a eventos de embolia microvascular e consequente isquemia²⁷. Em fumantes crônicos, a nicotina causa a redução na produção da prostaciclina, que possui um efeito vasoconstritor²⁸. A nicotina também estimula os quimiorreceptores da carótida e da aorta, causando liberação de catecolaminas, as quais induzem o aumento na pressão sanguínea e na demanda de oxigênio, dificultando o processo de cicatrização²⁷. Investigações clínicas mostram que o sangramento gengival, considerado como sinal precoce de inflamação na doença periodontal, é reduzido em fumantes crônicos²⁹. Fang *et al.*⁷ constataram que doses moderadas de nicotina inibem a proliferação de células osteoblásticas, suportando a evidência de que esta droga tem efeito direto sobre as células ósseas. Pinto *et al.*³ em um trabalho que avaliou a cicatrização de alvéolos em ratos, concluíram que a nicotina age na cicatrização dos alvéolos, com uma ação desfavorável manifestada por atraso na neoformação e organização óssea. Também observaram que os efeitos deletérios são diretamente relacionados à dosagem da droga. A nicotina interfere com a expressão de várias moléculas (BMP-2 e BMP-7, OPG, ATP6V0D2) no processo de formação óssea podendo prejudicar a cicatrização dos alvéolos, conforme descrito no trabalho de Giorgetti *et al.*²⁵. No presente trabalho, baseado na análise histomorfométrica que mostrou uma diferença estatisticamente significativa na porcentagem de formação óssea entre o grupo controle o grupo nicotina, a nicotina mostrou ser um fator prejudicial na cicatrização óssea no período de 14 dias após a exodontia, corroborando os trabalhos citados anteriormente. No entanto, no tempo de observação de 28 dias, esta diferença significativa não foi observada, provavelmente devido ao fato de que o grupo controle apresentou uma grande variação na porcentagem de formação óssea entre as amostras. Na análise microtomográfica foi observada diferença estatisticamente significativa na porcentagem de formação óssea entre os grupos controle e nicotina, tanto aos 14 quanto aos 28 dias de observação. Isto poderia ser explicado pela diferença entre os métodos de análises utilizados, porém mostrando o efeito da nicotina no atraso da formação óssea.

Sabendo-se que o processo de reparo ósseo pode sofrer a ação da nicotina, vários estudos são desenvolvidos na tentativa de minimizar tais efeitos deletérios sobre a cicatrização do osso e, com base nestes dados, o uso de lasers pode ser indicado como uma alternativa. O mecanismo de atuação dos lasers de baixa intensidade ainda não é completamente entendido. No entanto, além da bioestimulação das células, o laser

terapêutico possui ações antiinflamatória e analgésica³⁰. Reações tais como a promoção da síntese de ATP, estimulação da cadeia de transporte elétrica e a redução do pH celular formam a base que constitui os benefícios clínicos da laserterapia²⁰. Vários efeitos do uso do laser tem sido descritos na literatura, dentre eles, efeitos bioquímicos e modificações da membrana celular que podem aumentar a atividade dos macrófagos, fibroblastos, linfócitos e outras células envolvidas no reparo ósseo³¹; aumento do colágeno e da síntese de DNA, com rápida remoção de tecido necrótico³²; aumento na deposição de cálcio³³; aumento na função das células do periosteio³⁴; aumento da função de osteoblastos e osteócitos, estimulação de nova vascularização e da ossificação endocondral, diferenciação de células mesenquimais precocemente, aumento na quantidade de células progenitoras, e estímulo na formação de calo ósseo no processo de cicatrização óssea^{33,34}.

No presente trabalho, houve formação óssea tanto no grupo controle quanto no grupo laser, porém não foi observada diferença na análise histomorfométrica na porcentagem de formação óssea dos alvéolos no período de 28 dias. No entanto, no tempo de avaliação de 14 dias esta diferença foi estatisticamente significativa entre os grupos de animais que receberam ou não a aplicação do laser. Takeda² constatou que a deposição óssea iniciou-se antes nos animais que receberam o tratamento com o laser do que nos que não receberam, sugerindo que o laser de baixa potência, quando aplicado no alveolo de ratos pós-exodontia, tem um efeito benéfico nas fases iniciais da cicatrização e promove uma maior proliferação de fibroblastos e maior deposição óssea nos animais irradiados. O resultado deste trabalho vai de encontro ao descrito por Pinheiro *et al.*²² que constataram que o efeito biodomulador do laser é mais pronunciado nas fases iniciais da cicatrização óssea. Isto também pode ser justificado com base no trabalho de Ozawa *et al.*³⁵ que demonstraram *in vitro* que o estímulo da irradiação do laser após 14 dias de cicatrização não contribuiu para uma maior formação óssea considerando que neste período, os osteoblastos da calvária de ratos já estavam totalmente maduros e, provavelmente, menos sensíveis à ação do laser. Na avaliação microtomográfica, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e laser em ambos os tempos de avaliação.

A associação da laserterapia aos tratamentos convencionais tem como objetivo promover aumento na proliferação dos osteoblastos, deposição de colágeno e formação óssea³⁶. Com isso, no presente trabalho utilizou-se a laserterapia com o intuito de minimizar os efeitos deletérios da nicotina ao tecido ósseo. A metodologia de aplicação do laser utilizada neste trabalho e que trouxe resultados positivos com relação à porcentagem de formação óssea em alvéolos de ratos vai de encontro ao descrito por Schneider *et al.*³⁷ que

mostraram que múltiplas aplicações de laser são mais efetivas do que uma única dose. Seguindo tais recomendações, os alvéolos receberam aplicações de laser imediatamente após a exodontia, as quais foram repetidas duas vezes por semana com intervalo de um dia entre elas, durante duas semanas.

Foi observada maior porcentagem de formação óssea no grupo que recebeu a aplicação de laser, mesmo com os animais tendo sido expostos aos efeitos da nicotina, quando comparados ao grupo que não recebeu laserterapia. Não há estudos na literatura recente que utilizassem esta metodologia. Estes achados poderiam ser justificados com base nos trabalhos de Pretel *et al.*¹, Merli *et al.*²¹, Pinheiro *et al.*²² e Nicola *et al.*³⁸, os quais mostraram que o uso do laser foi capaz de aumentar a formação óssea em ratos. Embora estes autores não tenham investigado os efeitos da nicotina, poderia ser sugerido que o laser tenha trazido benefícios para o processo de reparo ósseo avaliado no presente estudo, uma vez que a laserterapia promove vasodilatação e angiogênese local aumentando a difusão de oxigênio através do tecido, o que aumenta a secreção de colágeno pelos fibroblastos no espaço extracelular, favorecendo o reparo ósseo em fumantes³⁹. Além disso, parece que os processos metabólicos das células são evidenciados devido à fotorecepção mitocondrial da luz monocromática. Os resultados encontrados no trabalho de Gouveia *et al.*⁴⁰ revelaram que a laserterapia promoveu um efeito adicional de fotobiomodulação que superou os efeitos inibitórios da nicotina, ainda que a metodologia usada no trabalho não tenha permitido clarificar o mecanismo exato pelo qual o laser promoveu este efeito compensatório na matriz extracelular e também na proliferação dos fibroblastos. Com relação à análise microtomográfica, no presente trabalho foram observados os mesmos resultados obtidos na análise histomorfométrica, ou seja, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nicotina e nicotina/laser, em ambos os tempos de avaliação. Foi observado que o grupo nicotina/laser no período de 14 dias mostrou porcentagem de formação óssea similar ao grupo nicotina no período de 28 dias, evidenciando que a ação do laser promoveu o reparo ósseo em um tempo reduzido, que corresponde a metade do tempo de cicatrização encontrada no grupo nicotina.

Interessante salientar a diferença de resultados que o laser demonstrou, no período de 28 dias, quando aplicado sobre o alvéolo de animais não expostos à nicotina comparados com o alvéolo de animais expostos à droga. O laser atuou de forma mais eficaz no grupo nicotina/laser, onde os resultados foram significativamente superiores ao grupo nicotina, o que não ocorreu com o grupo laser comparado ao grupo controle. É conhecido o fato de que a resposta celular ao tratamento com o laser de baixa intensidade é mais intenso sob

situações adversas^{41,42}. Considerando a nicotina como um fator agravante, pode-se sugerir que obteve-se melhora na porcentagem de osso do grupo nicotina/laser mesmo após 28 dias quando comparado ao grupo laser. Além disso, o grupo laser não diferiu estatisticamente do grupo controle, possivelmente associado também a grande variabilidade encontrada entre as amostras do grupo controle.

Do ponto de vista clínico, os resultados deste experimento poderiam suportar relatos de um estudo que avaliou, radiograficamente em humanos, o padrão de preenchimento ósseo dos alvéolos de fumantes e não fumantes após procedimento de exodontia. Os autores relataram que a nicotina interfere sobre a neoformação óssea após a exodontia, o que foi visualizado pela redução da densidade óssea ao compararem o reparo entre fumantes e não fumantes⁴³. Além disso, pacientes fumantes apresentam maior perda óssea após procedimentos de exodontia, comparados a paciente não fumantes^{43,44}. Nestes casos, o laser poderia atuar como coadjuvante do tratamento convencional em fumantes, no intuito de obter uma melhor cicatrização óssea, o que é de extrema importância para a reabilitação bucal destes pacientes.

Conclusão

Com base nos resultados deste estudo foi possível concluir que:

- a ação da nicotina interfere negativamente sobre o reparo ósseo de alvéolos de ratos pós-exodontia, o que foi evidenciado pela menor porcentagem de formação óssea nestas áreas;
- o laser de baixa intensidade em alvéolos de ratos pós exodontia promove uma maior porcentagem de formação óssea em animais expostos aos efeitos da nicotina;

Referências

1. Pretel H, Lizarelli RF, Ramalho LT. Effect of low-level laser therapy on bone-repair: histological study in rats. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 788-96.
2. Takeda Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1988; 17: 388-391.
3. 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.
4. Meechan JG, Macgregor ID, Rogers SN, Hobson RS, Bate JP, Dennison M. The effect of smoking on immediate post- extraction socket filling with blood and on the incidence of painful socket. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1988; 26: 402-409.
5. Daftari TK, whitesides TE, Heller JG, Goodrich AC, McCarey BE, Hutton WC. Nicotine on the revascularion of bone graft. An experimental study in rabbits. *Spine* 1994; 19: 904-911.
6. Jones J, Triplett R. The relationship between cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: a review of evidence and implicatons for patient care. *J Oral Maxillofac surg* 1992; 50- 237.
7. Fang Y, Frost P. Iida-Klein A, Hanhn T. Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Bone* 1991; 12:283-286.
8. Clarke NG, Stephard BC, Hirsch RS. The effect of intra-arterial epinephrine and nicotine on gingival circulation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1981; 52: 577-582.
9. Jensen J, Goodson W. Hopf H. Hunt TK. Cigarette smoking decreases tissues oxygen. *Archives of Surgery* 1991; 126: 1131-1134.
10. Sun G, Tuner J. Low level laser therapy in dentistry. *Dent clin North Am* 2004; 48: 1061-1076.
11. Hollinger JO, Schmitt JM, Hwang K, Soleymani P, Buck D. Impact of nicotine on bone healing. *J biomed Mater Res* 1999; 45: 294-301.
12. Johnson K. A study of the dimensional changes occurring in the maxilla following tooth extraction. *Aust Dent J* 1969; 14: 241.
13. Mosely LH, Finseth F, Goody M. Nicotine and its effect on wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1978; 61: 570-575.
14. Kon K. In vivo study of low power laser irradiation on new bone formation of rat calvaria defect. *J Jpn Soc Laser Dent* 1992; 3: 35-44.
15. Colan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J clin Periodontol* 1996; 23: 492-496.

16. Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, Dawes KS, Barham CD, Waddel DL, Enwemehka CS. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg* 2004; 22: 199-204.
17. Garcia VG, de Lima MA, Okamoto T, Milanezi LA, Júnior EC, Fernandes La, de Almeida JM, Theodoro LH. Effect of photodynamic therapy on the healing of cutaneous third-degree-burn: histological study in rats. *Lasers Med Sci* 2009; 25: 221-228.
18. Benedicenti, A. *Atlante di laser terapia*. 2 edizioni d'Arte, Genova 1983.
19. Brugnera A, Villa RG, Genovese, WJ. *Laser na odontologia*. 1991.
20. Karu TI. Molecular mechanisms of the therapeutic effects low intensity laser radiation. *Lasers life Sciences* 1989; 2: 53-74
21. Merli LAS, Santos MTBR, Genovese WJ, Faloppa F. Effect of low-intensity Laser Irradiation on the Process of Bone Repair. *Photomed laser surg* 2005; 23: 212-215.
22. Pinheiro AL, Limeira Junior Fde A, Gerbi ME, Ramalho LM, Marzola C, Ponzi EA, Soares AO, de Carvalho LCB, Lima HCV, Gonçalves TO. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. *J Clin Laser Med Surg* 2003; 21: 301-306.
23. Coombe, AR, Ho CT, Darendelie MA, Hunter N, PhilipsJR, Chapple CC, Yum LW. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod res* 2001; 4: 3-14.
24. Okamoto M, Kita T, Okuda H, Tanaka T. Effects of aging on acute toxicity of nicotine in rats. *Pharmacol Toxicol* 1994; 75: 1-6.
25. Giorgetti APO, Cesar JB Neto, Ruiz KGS, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Cigarette smoke inhalation modulates gene expression in sites of bone healing: a study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 110: 447-452.
26. Barushka O, Yaakobl T, Oron U. Effects of low energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rats tibia. *Bone* 1995; 16: 47-55.
27. Nolan J, Jenkins RA, Kurihara K, schultz RC. The acute effects of cigarette smoke exposure on experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1985; 75: 544-549.
28. Nadler JI, Velasco JS, Horton R(1983). Cigarette smoking inhibits protacyclin formation. *Lancet* 1985; 1:1248-1250
29. Bergstrom J, Preber H. Tobacco use as a risk factor. *J periodontol* 1994; 65: 545-550.
30. Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med* 1985; 5: 31-9.
31. Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers in Surgery and Medicine* 1989; 9: 497-505.

32. Gordjestani M, Dermaut L, Thierens H. Infrared laser and bone metabolism: A pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1994; 23: 54-56
33. Yamada K. Biological effects of low power laser irradiation on clonal osteoblastic cells (MC3T3-E1). *The Journal of the Japanese Orthopedic Association* 1991; 65: 101-104.
34. Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidate faster with low power laser. *Lasers Surgical Medicine* 1987; 7: 36-45.
35. Ozawa Y, Shimizu N, Karaya 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.
36. Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low- energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med* 2000; 26: 282-291.
37. Schneider NP, Soudry M, Remusat M, Franquim JC, Martin PM. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblasts. *Quintessence Int* 1989; 20: 887-893.
38. Nicola RA, Jorgetti Y, Rigau J, Pacheco MT, dos Reis LM, Zangaro RA. Effect of low – power GaAlAs laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci* 2003; 18: 89-94.
39. Al-Watban FAH, Zhang XY, Andres BL. Low–level laser therapy enhances wound healing in diabetic rats: a comparison of different lasers. *Photomed Laser surg* 2007; 25: 72-77.
40. Gouveia VG, Macarini VC, Almeida JM, Bosco AF, Nagata MJH, Okamoto T, Longo M, Theodoro LH. Influence of low level laser therapy on wound healing in Nicotine-treated animals. *Lasers Med Sci* 2012; 27: 437-443.
41. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblast proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers surg Med* 2001; 29: 179-184.
42. Korany NS, Mehanni SS, Hakam HM, Maghraby EMF. Evaluation of socket healing in irradiated rats after diode laser exposure (histological and morphometric studies). *J archives of oral biology* 2012; 57: 884-891.
43. Saldanha JB, Casati MZ, Haiter F neto, Sallum EA, Nociti FH Jr. Smoking may affect the alveolar process dimension and radiographic bone density in maxillary extraction sites: a prospective study in humans: *J Oral maxillofac surg* 2006; 64: 1359-1365.
44. Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: A clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodont Restor Dent* 2003; 23: 313.

INFLUENCE OF LOW-LEVEL LASER THERAPY ON BONE HEALING IN NICOTINE EXPOSED ANIMALS

Rita de Cassia Pucci da Silva^{*}, DDS; Sung Hyun Kim^{*}, DDS, PhD; Vinicius Augusto Tramontina^{*}, DDS, PhD; Vula Papalexiou^{*}, DDS, PhD; Gustavo Bento^{*}, MS; Laura Tozzo^{*}, DDS; Sérgio Aparecido Ignácio^{*}, DDS, PhD; Aline Rodrigues Johann^{*}, DDS, PhD; Thiago Gomes^{**}, Sônia Mara Luczyszyn^{*}, DDS, PhD

^{*} Escola de Ciências da Vida (ECV), Curso de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR, Brasil.

^{**} Laboratório de análises de minerais e rochas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil.

Corresponding author:

Sonia Mara Luczyszyn, DDS, PhD

Escola de Ciências da Vida (ECV)

Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Rua Imaculada Conceição, 1155

80215-901 Curitiba, PR, Brazil

Phone/Fax: +55 (41) 9975 5959/3322 7531

e-mail: sonia.luczyszyn@pucpr.br

Abstract

The purpose of the study was to analyse the Influence of Low level laser therapy (LLLTT) on bone healing in animals exposed or not to nicotine. 40 Wistar male rats were used, divided in 4 groups: Control (C), Laser (L), Nicotine (N) e Nicotine/Laser (NL). The animals received injections of nicotine solution (groups N and NL) or saline solution (groups C and L). The injections were applied for 8 weeks, excluding the days when surgery was performed. On day 28, the first right mandibular molars were extracted. Application of LLLTT for the groups L and NL was performed immediately after the surgery and repeated twice a week for 14 days. After 14 days of the first surgery, the same procedures previously performed on the right side were performed on the left side. The animals were euthanized 28 days after the first surgical procedure. It was possible to observe, in the microtomography analysis, that the N group showed smaller percentage of bone formation compared to the other groups, regardless of the observation period, 14 or 28 days. The histomorphometry analysis showed that the N group, on 14 days, had smaller percentage of bone formation when comparing to C and NL groups. Moreover, NL group, despite the analysis period, showed greater bone formation percentage when comparing to N group. The L group showed higher bone formation percentage comparing to C group, at 14 days. The findings that I have presented suggest that nicotine interferes with bone healing, which was made clear by the lower percentage of bone formed in the tooth sockets from the Nicotine group. In addition, the LLLTT when applied to post-extraction sockets of rats exposed to nicotine promoted higher bone formation.

Introduction

Many clinical and epidemiologic studies indicate that nicotine jeopardize the response to surgical and nonsurgical procedures^{1,2,3}. In fact, Smoking is reported to negatively affect bone healing after tooth extraction, leading to a higher incidence of pain and reduced socket blood fill⁴. Tobacco may interfere on fracture consolidation and bone healing as well as diminish osteoblast function⁵. A 15 patient clinical study revealed that 80% of the individuals who underwent intraoral surgical procedures presenting impairment of bone healing were smokers⁶. Furthermore, nicotine has been shown to inhibit fibroblast proliferation, as well as, diminish extracellular matrix production and enhance collagenase production⁷. Nicotine is strongly addictive, a neuroactive substance which may cause vasoconstriction⁸ and, consequently, decreases blood flow and peripheral oxygen tension^{5,9,10}. In addition, it may reduce vascular ingrowth and osteogenesis^{5,11}, delay alveolar healing of extraction sockets, and delay wound healing^{12,13}. Nicotine produces important harmful effects on the vascularization, healing and bone remodeling processes^{5,11}.

Low Level Laser Therapy (LLLT) is a well known tool used in dentistry due to its anti-inflammatory, analgesic and regenerative effects¹⁴. LLLT stimulates wound healing and collagen synthesis¹⁵. Moreover, it promotes repair of skin, ligaments, tendons, bone and cartilage in experimental animals¹⁶. LLLT incites different biological responses which increases cellular metabolism, enhances regenerative potential and promotes anti-inflammatory effect with analgesia and vasodilatation¹⁷. A study by Benedicenti¹⁸ has concluded that, after the application of LLLT there is an increase of Beta-endorphin, promoting an analgesic effect. LLLT also promotes breaking of mastocyte membrane, increases vascular permeability, and acts in the prostaglandin, inhibiting and blocking actions of the enzyme cyclooxygenase, with an anti-inflammatory effect¹⁹. The biostimulating effect of LLLT provokes an increase in adenosine triphosphate (ATP) resulting in cellular division acceleration which stimulates regeneration of blood vessels, increasing the tissue healing ability²⁰. In vivo studies have shown increase on bone deposition in post-extraction sockets that had been previously treated with LLLT suggesting it may have intensify new bone formation^{1,21,22}.

The mechanisms by which LLLT improves bone healing are not yet fully understood²³; however, since LLLT has not demonstrated adverse effects so far, it could act as a highly beneficial supporting factor on bone repair¹⁰. The present study had the purpose of analysing through microtomography and histomorphometry analysis the influence of LLLT on the

percentage of bone formation of post-extraction sockets in animals exposed or not to nicotine.

Materials and Methods

This study was revised and approved by Comitê de Ética no Uso de Animais da PUCPR (CEUA, number 879). 40 wistar rats aged 120 days weighting 280-320g were used. They were housed in an air-conditioned room with automatically controlled temperature (20°C) and 12-h light-dark intervals and free acces to food and water.

The rats were divided in 4 groups; however, 4 animals deceased throughout the project:

Control group (C): 9 animals;

Laser group (L): 9 animals;

Nicotine group(N): 9 animals;

Nicotina/laser group (NL) : 9 animals.

All animals from N and NL groups were injected with nicotine hemisulphate (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) diluted in saline at concentration of 5mg/ml. Each rat received a volume of the diluted solution calculated as 3kg/kg weight according to the procedure proposed by Okamoto et al²⁴. They received injections twice a day (7 a.m. and 7p.m.) during 4 weeks prior surgical procedures extending for more 4 weeks until euthanasia, totalizing 8 weeks of exposing to nicotine.

The C and L group animals received the same volume of saline solution instead of nicotine, following the same protocol.

To avoid bruises and minimize stress, the injections were alternate in back, right and left abdome. For these injections insuline needles BD®ultrafine were used (Franklin Lakes, New Jersey, USA).

SURGICAL TECNIQUE

Initially, the animals received sedative Rompun (Bayer S.A. Leverskusen, Germany) 1,5 ml/kg. Afterwards, they were anesthetized with an intramuscular injection of ketamine (Ketalar injetável – Achè S.A., Ticino, Switzerland) 75mg/kg weight. Moreover, they also received locoregional by 3% Lidocaine, containing norepinephrine 1:50.000 (DLA Pharmaceutical LTDA, Alcabideche, Portugal).

For the surgery, the animals were maintained in supine position, with their mouth opened through elastics.

After the locoregional anesthesia, using blade n15 (Solidor, Osasco, SP, Brazil) a sulcular incision was performed around the first right mandibular molar, then the gingival tissue around the tooth was retracted.

To extract the tooth, a hollemback espatula number 6 was used (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brazil). After the tooth extraction, the socket was sutured with Nylon 5.0 (Ethicon Johnson & Johnson®, New Brunswick, New Jersey, USA.) Next, one single dosis of Penicilina-G Benzatina 30000 UI and e 200mg/Kg Paracetamol was administered.

After 14 days , the animals were submitted to the same procedures perfomed previously, however, on the left side. They underwent the same treatments executed on the right side.

LOW INTENSITY LASER THERAPY

Immediately after tooth extraction, the L and NL groups were treated by LLLT(Fig. 1). The treatment continued twice a week for 2 weeks. The protocol used was the one following the laser manufacturing directions for bone bioestimulation. (whitening Lase II DMC, São Carlos, São Paulo, Brazil) A continuous wavelenght of 808 nm was used (infrared) and a power output of 100mW. Energy applied was of 3,3 J, 33 s for each point (one for each post-extraction socket).

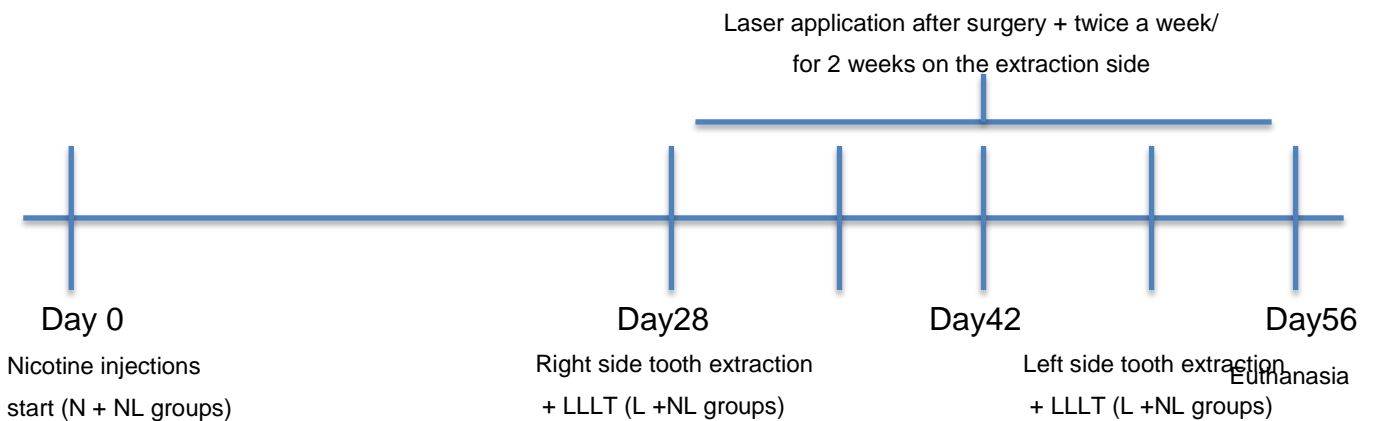


Fig. 1. Post-extraction socket, LLLT application area.

EUTHANASIA

After 28 days from the first surgery, the animals were killed by a lethal dose of anesthetic solution of Ketamine (Ketalar injetável, Achè Laboratórios Farmacêuticos S.A., Ticino, Switzerland). The mandibles were fixed in 10% formalin for 24 h. First of all, the specimens were taken for the lab to go through microtomography procedures, posteriorly, they were processed by routine laboratory procedures and examined for a blind examiner.

The methodology used proceeded as the following sequence:



MICROTOMOGRAPHY ANALYSIS

The microtomography analysis were performed using SkyScan (Bruker, 1172, 2010, Kontich, Belgium). Each specimen was posicioned on a support and analyzed separately. The especifications used for the images were adjusted by a technician, each microtomography took around 11 minutes.

The images were captured using the NRECON v1.6.10. software (Bruker, Kontich, Belgium), in which the image reconstruction was made in transversal sections. All the pictures needed to be visually adjusted, considering brightness and contrast. Using CT Analyser software version: 1.9.1.0.© 2003-08 SkyScan (Bruker, Kontich, Belgium), became possible to separate one side of the mandible from the other, to analyse each separately. Thus, with DATAViewer v1.5.2. software (Bruker, Kontich, Belgium) it was possible to obtain sagittal sections for each sample. Posteriorly, the sagital image was analysed in the CT Analyser software v1.9.1.0.© 2003-08 SkyScan, (Bruker, Kontich, Belgium), leading to a quantitative analysis.

The distal root socket area, set by the space between the two proximal bone crests was delimited on the sagittal tomography sections to be converted in greyscale. Using the binarization process (Figs. 2 e 3) was possible to separate 2 different density phases (greyscale goes from 0-255). The binarization was set by visual direct comparison of the sagittal sections images with the software. For the radiopaque images (suggesting mineralized tissue) was used the interval from 61-255 of the greyscale. The amount left of the greyscale, 0-60, was characterized by the higher radiopacity images (suggesting connective tissue and empty space).

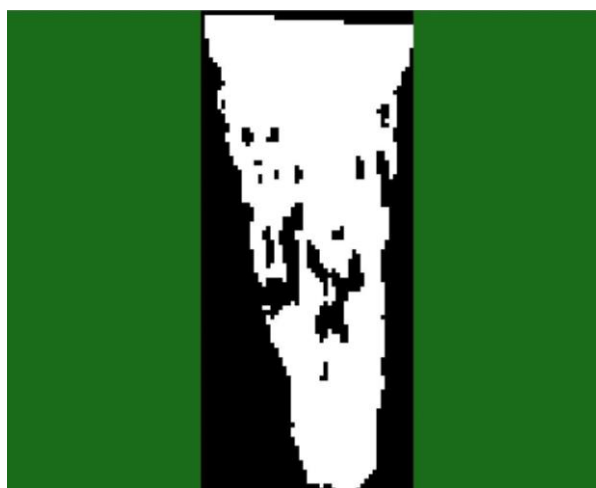


Fig 2. Interval 0-60 (suggesting connective tissue)

and empty space)



Fig 3. Interval 61-255 (suggesting mineralized tissue)

HISTOMORPHOMETRY ANALYSIS

All specimens were washed and soaked in 10% EDTA for descalcification for 8 weeks, and then rinsed in distilled water. Specimens were dehydrated in ascending grades of alcohol and embedded in paraffin. Sagittal, mesiodistal sectioning of the jaws was carried out. Histological sections were prepared of 5 μm thickness. The prepared sections were subjected to Sirius Red staining.

The blades were scanned using the Axio Scan Z1 scanner (Zeiss, Germany) (Fig4) using an magnifications of 2,5x. An area of 492189 μm^2 was analysed. The connective tissue portion was removed using the Photoshop CS6 software (Adobe, San Jose, CA, USA) (Fig. 5). Using the Image Pro Plus 4 (Media Cybernetics, INC. Rockville, MD, USA), the distal root socket area, set by the space between the two proximal bone crests was delimited, following the methodology recommended by Giorgetti *et al.*²⁵. This procedure was performed in two moments, with a 20 day interval due to calibrate the examiner. Using a mask made especially for this reading, the colors corresponding to bone tissue and empty space were identified, using the delimitation technique developed by Barushka *et al.*²⁶(Fig. 6). Thus, the percentage of bone tissue formed was obtained inside this demarcated area.

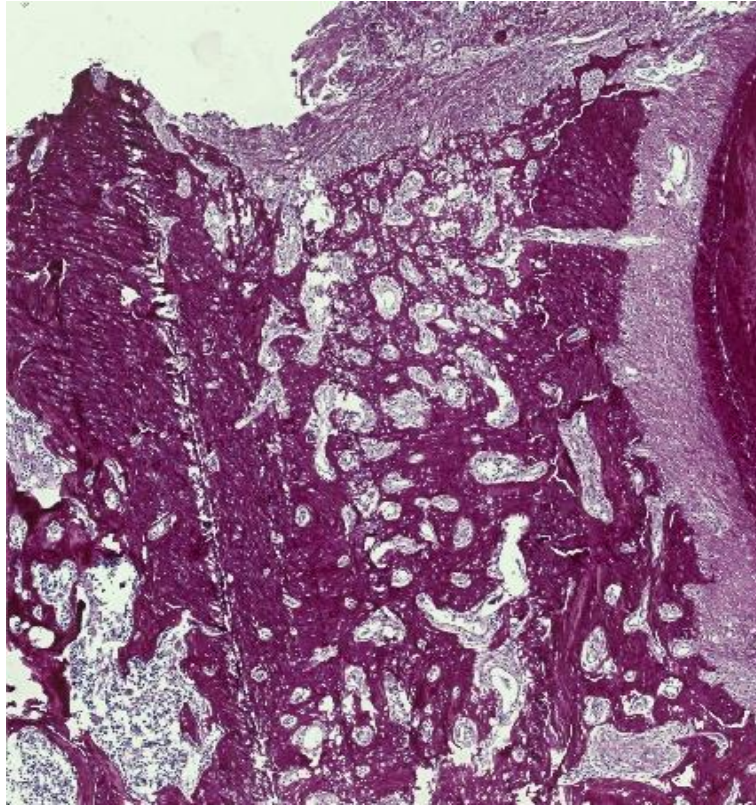


Fig 4. Scanned blade (Sirius Red 2,5x).

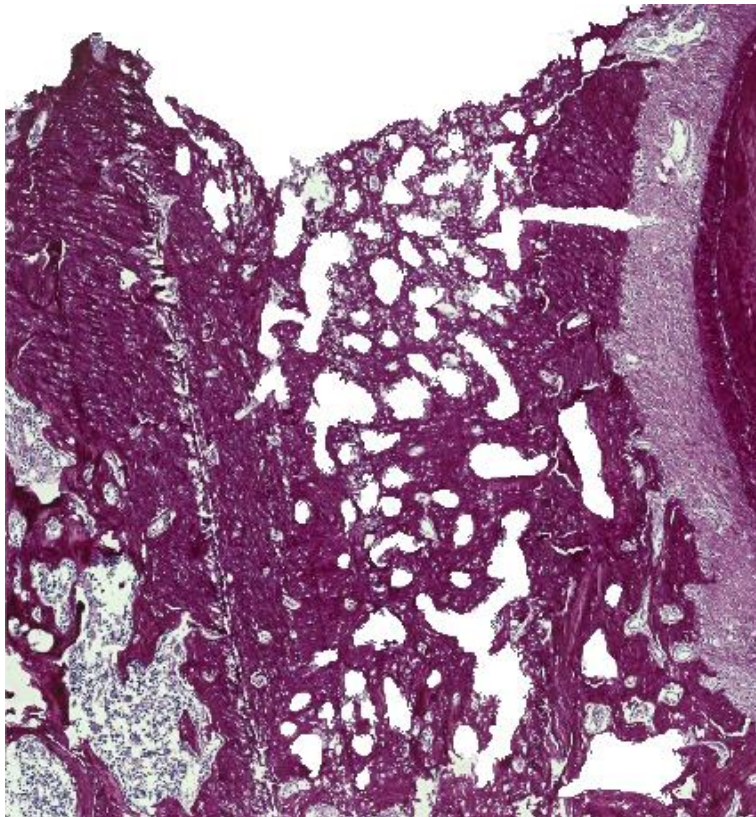


Fig 5. Connective tissue removed using Photoshop CS6 software (Sirius Red 2,5x).

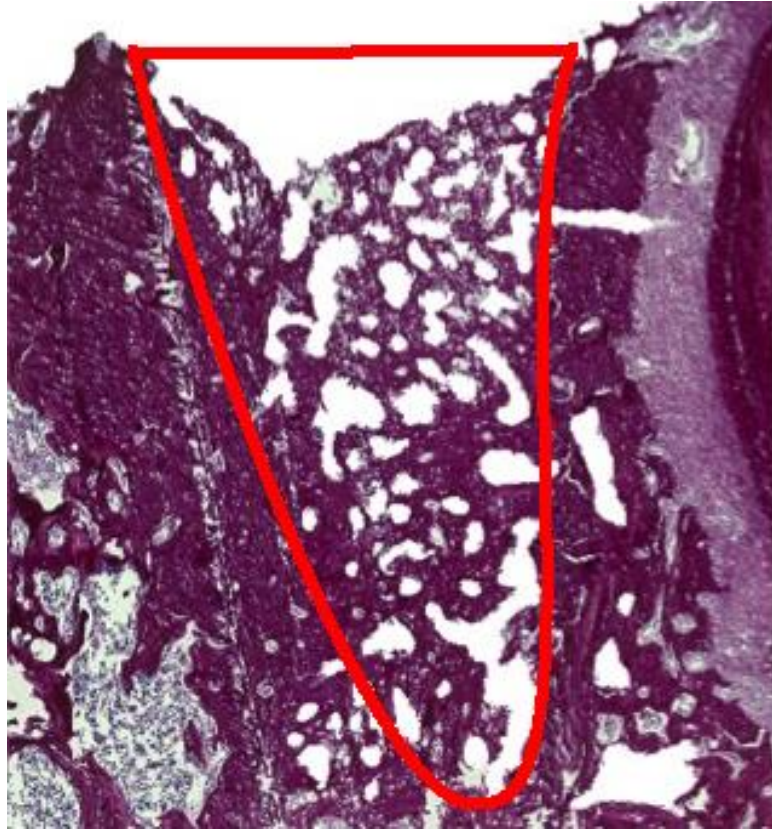


Fig 6. Delimitation of post-extraction socket using Image Pro Plus 4 software (Sirius Red 2,5x).

ESTATISTICS ANALYSIS

The estatistic analysis was performed using the SPSS software(16.0 version; IBM-SPSS, Armonk, NY). The significance level adopted was $p < 0,05$. Aiming to compare if there was any diferece between the averages of bone formation percentage, considering group and time, inicially it was used the Kolmogorov Smirnov test, to test the normality of data. To test homogeneity between data, it was usYd Levene test. The comparison of bone formation avarege, considering group and time was performed using two-way ANOVA. When the later showed difference between group and group/time, it was used Tukey test. For heterogeneity data Games-Howell test was performed.

Results

MICROTOMOGRAPHY ANALYSIS

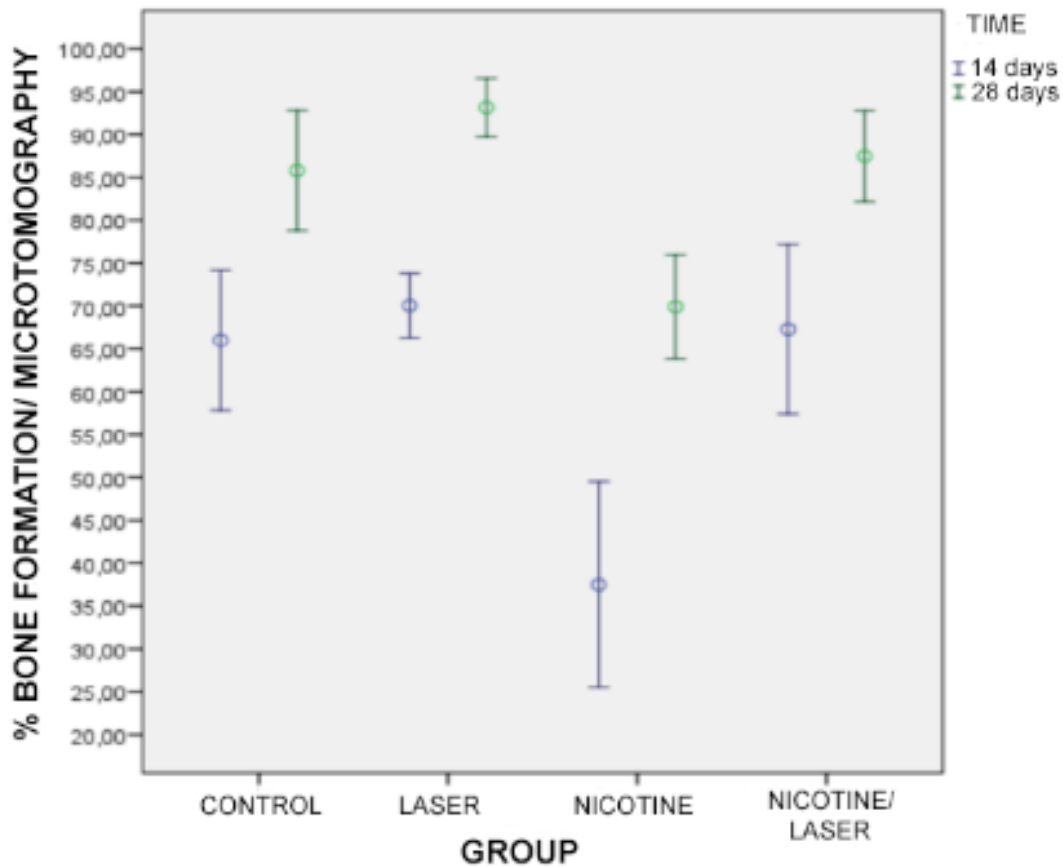
On the microtomography images the Nicotine group showed lower percentage of bone formation than the other groups, whether the period of 14 days was taken in consideration or the period of 28 days ($p < 0,05$). In contrast, the Nicotine/Laser group, independently analysis period, has shown higher bone formation percentage than the N group ($p < 0,05$).

14 DAYS	CONTROL (N=8)	LASER (N=7)	NICOTINE (N=6)	NICOTINE/ LASER (N=8)	p VALUE
% BONE FORMATION/ MICROTOMOGRAPHY (average \pm dp)	66.01 \pm 9.8	70.04 \pm 4.09	37.50 \pm 11.44	67.29 \pm 9.43	p<0,05

Table 5. Tukey test ($p < 0,05$)

28 DAYS	CONTROL (N=6)	LASER (N=7)	NICOTINE (N=8)	NICOTINE/ LASER (N=9)	p VALUE
% BONE FORMATION/ MICROTOMOGRAPHY (average \pm dp)	85.79 \pm 6.68	93.14 \pm 3.68	69.91 \pm 7.27	87.47 \pm 6.91	p<0,05

Table 6. Tukey test ($p < 0,05$)



HISTOMORPHOMETRY ANALYSIS

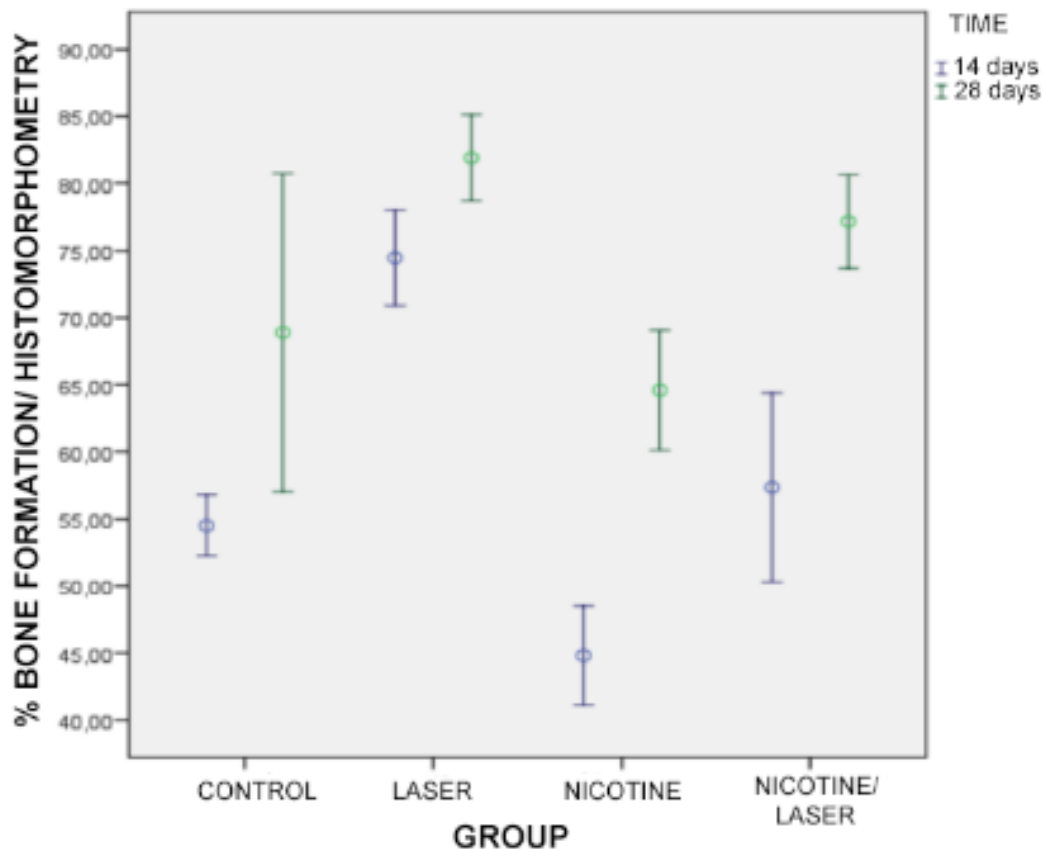
In the histomorphometry analysis, the group N, at 14 days, has had the lower bone formation percentage comparing to C and NL groups ($p < 0,05$). Furthermore, NL group has shown higher percentage of bone formation at 14 days as well as at 28 days of analysis period ($p < 0,05$). L group has demonstrated a higher percentage of bone formation in comparison to group C, at 14 days ($p < 0,05$).

14 DAYS	CONTROL (N=8)	LASER (N=7)	NICOTINE (N=6)	NICOTINE/ LASER (N=8)	p VALUE
% BONE FORMATION/ HISTOMORPHOMETRY (average ± dp)	54.51±2.72	74.48±3.84	44.81±3.51	57.35±6.70	$p < 0,05$

Table 7. Games-Howell test ($p < 0,05$)

28 DAYS	CONTROL (N=6)	LASER (N=7)	NICOTINE (N=8)	NICOTINE/ LASER (N=9)	p VALUE
% BONE FORMATION/ HISTOMORPHOMETRY (average ± dp)	68.89±11.30	81.92±3.46	64.58±5.34	77.16±4.52	$p < 0,05$

Table 8. Games-Howell test ($p < 0,05$)



Discussion

An important effect of nicotine is vasoconstriction, which may predispose to thrombotic microvascular occlusion and consequent tissue ischemia²⁷. In chronic smokers, nicotine produces limited prostacyclin, which may have a vasoconstrictor effect²⁸. Moreover, it stimulates the carotid and aortic chemoreceptor bodies, causing catecholamine release from the adrenergic and adrenal medulla nerve endings, which induces an increase in blood pressure with a consequent oxygen demand, thus impairing the healing process²⁷. Clinical investigations showed gingival bleeding, considered to be an earlier sign to detect periodontal disease, is reduced in chronic smokers²⁹. Fang *et al.*⁷ found that moderate doses of nicotine diminish osteoblast proliferation, supporting the evidence that this drug has a direct effect on bone cells. Pinto *et al.*³ in their study which evaluated extraction socket healing in rats, concluded that nicotine acts negatively on bone healing, due to a delay in the organization and neoformation of the bone healing. They also observed that the Também observaram que os efeitos deletérios são diretamente relacionados à dosagem da droga. Nicotine interfere with the expression of a number of molecules which play a crucial role in bone healing (BMP-2 e BMP-7, OPG, ATP6V0D2) leading to an impaired socket healing, as described by Giorgetti *et al.*²⁵. In the present study, based on the histomorphometry analysis which

showed a significant statistically difference in the percentage of bone formation between the control and the nicotine group, nicotine seemed to be a harmful factor on the bone healing at 14 days, corroborating with the studies cited previously. However, at 28 days of observation, the difference was not significant, probably due to a high variation in the bone formation percentage between the specimens. In the microtomography analysis the difference was significant on the percentage of bone formation between groups C and N whether the period taken into consideration was 14 days or 28 days. This could be explained by the difference in the analysis methods used, yet showing the nicotine effect delaying bone formation.

Knowing that nicotine may affect bone healing process, several studies are developed to minimize the nicotine harmful effects on bone healing, and based on this data, LLLT could be an alternative. The biological and cellular mechanisms underlying LLLT have not been clarified. However, besides the cell biostimulation, LLLT has anti-inflammatory and analgesic properties³⁰. Cellular reactions as enhancement of ATP synthesis, stimulation of electric transport chain and pH reduction may form the basis for the clinical benefits of LLLT²⁰. Many LLLT effects has been described on literature, among them, there are biochemical and cell membrane changes which may increase macrophage, fibroblast, lymphocyte and other healing cells activities³¹; increase of collagen and DNA synthesis with accelerated removal of necrotic tissue³²; increase of calcium deposition³³; enhancement of periosteum cells function³⁴; growth in function of osteoblasts and osteocytes, new vascularization stimulation, stimulation of endochondral ossification, earlier differentiation of mesenchymal cells, increase of preosteogenic cells and stimulation of callus formation on the bone healing process^{33,34}.

In the present study, there was bone formation whether the observed group was the control or the Laser group, however, it was not significant on the histomorphometry analysis at 28 days. Nevertheless, at 14 days, this difference was considered to be significant between the group C and L. Takeda² concluded that bone deposition started before in the animals which have received the LLLT treatment than the ones which have not received. In fact, this suggests that the LLLT, when applied on post-extraction sockets in rats, has a beneficial effect in the earlier bone healing phases, and promotes a higher fibroblast proliferation and bone deposition on irradiated animals. This project result goes against the one described by Pinheiro *et al.*²² who found that the LLLT biomodulator effect is more pronounced in earlier bone healing phases. It can also be justified based in a study from Ozawa *et al.*³⁵ which showed *in vitro* that the irradiation stimuli after 14 days of bone healing has not contributed for a larger bone formation, considering that at this time, the rat calvaria osteoblast were already mature, probably insensitive to the LLLT effect. On the

microtomography, there was no significant difference between control and laser group in both periods of observation.

The association between LLLT and conventional treatments has the purpose to increase osteoblast proliferation, collagen deposition and bone formation³⁶. Based on this, the present study used LLLT in order to minimize the deleterious nicotine effects on bone healing. The methodology used for this project brought positive results related to the bone formation of post extraction sockets in rats going against the one described by Schneider *et al.*³⁷ which showed that multiple LLLT applications were more effective than one single dose. Following these recommendations, the applications were made right after the tooth extraction, which were repeated twice a week for two weeks.

It was observed higher bone formation percentage in the groups which received the LLLT application, even the one exposed to nicotine, when compared to the group N. There is no recent studies using such methodology used in this study. These findings could be justified based on Pretel *et al.*¹, Merli *et al.*²¹, Pinheiro *et al.*²² e Nicola *et al.*³⁸ studies, which showed that the LLLT were able to increase the bone formation in rats. Although, all these authors did not investigate the nicotine effects, it could be suggested that the LLLT could have brought benefits to bone healing in the present study, once LLLT promotes vasodilation and local angiogenesis, increasing oxygen diffusion throughout the tissue, what increases the collagen secretion by fibroblasts in extracellular space, favoring bone healing in smokers³⁹. Besides, it seems that the cells metabolic process are evidenced due to mitochondrial photoreception to monochromatic light. The results found by Gouveia *et al.*⁴⁰ revealed that LLLT promoted an photobiomodulation additional effect that surpassed the inhibitory effects of nicotine, even though the methodology used in their study did not allow them to clarify the exact mechanisms through which LLLT compensated for this inhibitory effect on the intercellular matrix and also fibroblast proliferation. Regarding the microtomography analysis, the results were the same as the ones obtained on the histomorphometry analysis, in other words, there was significant difference between both groups N and N/L, in both periods of observation, 14 and 28 days. It could be observed that the NL group at 14 days showed percentage of bone formation similar to the one of group N obtained at 28 days. Therefore, LLLT promoted bone healing in a reduced amount of time, corresponding to half of healing time found on Nicotine group.

It is interesting to emphasize the difference between the results that LLLT has shown in 28 days when applied on post-extraction socket of animals not exposed to nicotine compared with the ones of animals exposed to the drug. The laser has been more effective in

the group nicotine/laser, where the percentage of bone formation significantly superior to the one found on nicotine group, which did not occur with the laser group compared to the control group. It is well known that the cellular response to the LLLT treatment is more intense in adverse situations^{41,42}. Considering nicotine as an aggravating factor, it may be suggested because of this fact, nicotine/laser group obtained an improvement in the percentage of bone formation even after 28 days when compared to the laser group. Besides that, the laser group may have not differed statistically from the control group, possibly it could be associated to the high variability found between the control group samples.

From a clinical point of view, the results of this experiment could support reports of a study that evaluated radiographically in humans, the pattern of bone fill of smokers and nonsmokers alveoli after tooth extraction procedure. The authors reported that nicotine interferes with bone formation after tooth extraction, which was visualized by reduced bone density by comparing the bone healing between smokers and non-smokers⁴³. In addition, smokers have higher bone loss after tooth extraction procedures compared to non-smoker patients^{43,44}. In these cases, the LLLT could act as an adjunct to conventional treatment for smokers, in order to achieve better bone healing, which is extremely important for these patients oral rehabilitation.

In conclusion, according to the present results, nicotine may negatively interfere on bone healing in rats post-extraction sockets. On the other hand, LLLT could optimize bone formation on rats post-extraction sockets even when combined with nicotine. In order to avoid the deleterious effects of nicotine, we could use LLLT to promote an acceleration on bone healing.

References

1. Pretel H, Lizarelli RF, Ramalho LT. Effect of low-level laser therapy on bone-repair: histological study in rats. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 788-96.
2. Takeda Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1988; 17: 388-391.
3. 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.
4. Meechan JG, Macgregor ID, Rogers SN, Hobson RS, Bate JP, Dennison M. The effect of smoking on immediate post- extraction socket filling with blood and on the incidence of painful socket. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1988; 26: 402-409.
5. Daftari TK, whitesides TE, Heller JG, Goodrich AC, McCarey BE, Hutton WC. Nicotine on the revascularion of bone graft. An experimental study in rabbits. *Spine* 1994; 19: 904-911.
6. Jones J, Triplett R. The relationship between cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: a review of evidence and implicatons for patient care. *J Oral Maxillofac surg* 1992; 50- 237.
7. Fang Y, Frost P. lida-Klein A, Hanhn T. Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Bone* 1991; 12:283-286.

8. Clarke NG, Stephard BC, Hirsch RS. The effect of intra-arterial epinephrine and nicotine on gingival circulation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1981; 52: 577-582.
9. Jensen J, Goodson W, Hopf H, Hunt TK. Cigarette smoking decreases tissues oxygen. *Archives of Surgery* 1991; 126: 1131-1134.
10. Sun G, Tuner J. Low level laser therapy in dentistry. *Dent clin North Am* 2004; 48: 1061-1076.
11. Hollinger JO, Schmitt JM, Hwang K, Soleymani P, Buck D. Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res* 1999; 45: 294-301.
12. Johnson K. A study of the dimensional changes occurring in the maxilla following tooth extraction. *Aust Dent J* 1969; 14: 241.
13. Mosely LH, Finseth F, Goody M. Nicotine and its effect on wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1978; 61: 570-575.
14. Kon K. In vivo study of low power laser irradiation on new bone formation of rat calvaria defect. *J Jpn Soc Laser Dent* 1992; 3: 35-44.
15. Colan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 492-496.
16. Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, Dawes KS, Barham CD, Waddel DL, Enwemehka CS. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg* 2004; 22: 199-204.
17. Garcia VG, de Lima MA, Okamoto T, Milanezi LA, Júnior EC, Fernandes La, de Almeida JM, Theodoro LH. Effect of photodynamic therapy on the healing of cutaneous third-degree-burn: histological study in rats. *Lasers Med Sci* 2009; 25: 221-228.
18. Benedicenti, A. *Atlante di laser terapia*. 2 edizioni d'Arte, Genova 1983.
19. Brugnera A, Villa RG, Genovese, WJ. *Laser na odontologia*. 1991.
20. Karu TI. Molecular mechanisms of the therapeutic effects low intensity laser radiation. *Lasers life Sciences* 1989; 2: 53-74
21. Merli LAS, Santos MTBR, Genovese WJ, Faloppa F. Effect of low-intensity Laser Irradiation on the Process of Bone Repair. *Photomed laser surg* 2005; 23: 212-215.
22. Pinheiro AL, Limeira Junior Fde A, Gerbi ME, Ramalho LM, Marzola C, Ponzi EA, Soares AO, de Carvalho LCB, Lima HCV, Gonçalves TO. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. *J Clin Laser Med Surg* 2003; 21: 301-306.
23. Coombe, AR, Ho CT, Darendelier MA, Hunter N, PhilipsJR, Chapple CC, Yum LW. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod res* 2001; 4: 3-14.

24. Okamoto M, Kita T, Okuda H, Tanaka T. Effects of aging on acute toxicity of nicotine in rats. *Pharmacol Toxicol* 1994; 75: 1-6.
25. Giorgetti APO, Cesar JB Neto, Ruiz KGS, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Cigarette smoke inhalation modulates gene expression in sites of bone healing: a study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 110: 447-452.
26. Barushka O, Yaakobi T, Oron U. Effects of low energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rats tibia. *Bone* 1995; 16: 47-55.
27. Nolan J, Jenkins RA, Kurihara K, schultz RC. The acute effects of cigarette smoke exposure on experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1985; 75: 544-549.
28. Nadler JI, Velasco JS, Horton R(1983). Cigarette smoking inhibits protacyclin formation. *Lancet* 1985; 1:1248-1250
29. Bergstrom J, Preber H. Tobacco use as a risk factor. *J periodontol* 1994; 65: 545-550.
30. Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med* 1985; 5: 31-9.
31. Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers in Surgery and Medicine* 1989; 9: 497-505.
32. Gordjestani M, Dermaut L, Thierens H. Infrared laser and bone metabolism: A pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1994; 23: 54-56
33. Yamada K. Biological effects of low power laser irradiation on clonal osteoblastic cells (MC3T3-E1). *The Journal of the Japanese Orthopedic Association* 1991; 65: 101-104.
34. Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidate faster with low power laser. *Lasers Surgical Medicine* 1987; 7: 36-45.
35. Ozawa Y, Shimizu N, Karaya 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.
36. Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low- energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med* 2000; 26: 282-291.
37. Schneider NP, Soudry M, Remusat M, Franquim JC, Martin PM. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblasts. *Quintessence Int* 1989; 20: 887-893.
38. Nicola RA, Jorgetti Y, Rigau J, Pacheco MT, dos Reis LM, Zangaro Ra. Effect of low – power GaAlAs laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci* 2003; 18: 89-94.
39. Al-Watban FAH, Zhang XY, Andres BL. Low–level laser therapy enhances wound healing in diabetic rats: a comparison of different lasers. *Photomed Laser surg* 2007; 25: 72-77.

40. Gouveia VG, Macarini VC, Almeida JM, Bosco AF, Nagata MJH, Okamoto T, Longo M, Theodoro LH. Influence of low level laser therapy on wound healing in Nicotine-treated animals. *Lasers Med Sci* 2012; 27: 437-443.
41. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblast proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers surg Med* 2001; 29: 179-184.
42. Korany NS, Mehanni SS, Hakam HM, Maghraby EMF. Evaluation of socket healing in irradiated rats after diode laser exposure (histological and morphometric studies). *J archives of oral biology* 2012; 57: 884-891.
43. Saldanha JB, Casati MZ, Haiter F neto, Sallum EA, Nociti FH Jr. Smoking may affect the alveolar process dimension and radiographic bone density in maxillary extraction sites: a prospective study in humans: *J Oral maxillofac surg* 2006; 64: 1359-1365.
44. Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: A clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodont Restor Dent* 2003; 23: 313.

Material e Método completo

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da PUCPR sob parecer número 879 (Anexo).

Foram utilizados 40 ratos machos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), provenientes do Biotério da PUC/PR, com idade de 120 dias e peso entre 280-320g.

Os animais foram armazenados em gaiolas plásticas com grade metálica com no máximo 3 animais em cada uma delas. Receberam dieta composta de ração e água *ad libitum*.

Foram utilizados 40 animais, porém durante o trabalho 4 deles foram perdidos. Os animais foram divididos em 4 grupos:

Grupo Controle (C): 9 animais;

Grupo Laser(L): 9 animais;

Grupo Nicotina (N): 9 animais;

Grupo Nicotina/laser (NL) : 9 animais.

Todos os animais dos grupos nicotina e nicotina-laser receberam solução de Hemissulfato de Nicotina (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) diluída em solução salina a uma concentração de 5mg/mL. Cada rato recebeu um volume de solução diluída calculada

como 3 mg/kg/dia dividida em 2 aplicações (7h e 17h), pelo período de 4 semanas que antecederam os procedimentos cirúrgicos e continuaram por mais 4 semanas até o dia da eutanásia, totalizando 8 semanas de exposição à droga, de acordo com o protocolo proposto por Okamoto *et al.*

Os animais dos grupos controle e laser receberam o mesmo volume de solução injetável, porém em forma de solução salina sem a nicotina diluída, seguindo o mesmo protocolo.

Para evitar hematomas e minimizar o estresse, as aplicações foram alternadas na região do dorso, ventre direito e ventre esquerdo dos animais. Para tal, foram utilizadas agulhas de insulina BD®ultrafine (Franklin Lakes, New Jersey, EUA).

TÉCNICA CIRÚRGICA

Os animais receberam relaxante muscular e sedativo de uso animal Rompun (Bayer S.A. Leverskusen, Alemanha) na dosagem de 1,5 ml/kg. Foram submetidos à anestesia geral por meio de injeção intramuscular de Cloridrato de Ketamina (Ketalar injetável – Achë Laboratórios Farmacêuticos S.A., Ticino, Suíça) na dosagem de 75 mg/kg de massa corporal. Também receberam anestesia local infiltrativa com Lidocaína a 3%, contendo Norepinefrina 1:50.000 (DLA Pharmaceutical LTDA, Alcabideche, Portugal).

Para cirurgia, os ratos foram imobilizados em decúbito dorsal e posicionados sobre mesa operatória própria para a contenção e abertura da boca, mantida por meio de elásticos ancorados aos incisivos superiores e inferiores (Figs. 1 e 2).



Fig. 1. Posicionamento do animal em decúbito dorsal.



Fig. 2. Visualização do primeiro molar inferior direito.

Após a anestesia local (Fig. 3), utilizando lâmina de bisturi n°15 (Solidor, Osasco, SP, Brasil) foi realizada incisão intrasulcular no primeiro molar mandibular direito (Fig. 4) e em seguida (Fig. 5), foi realizado o descolamento do tecido gengival com o uso de descoladores e periótomos (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil.) (Fig. 6).

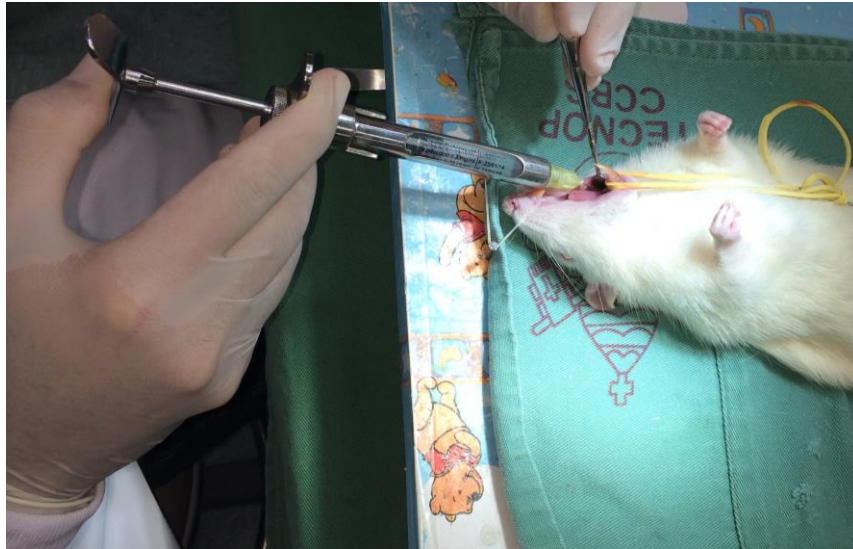


Fig. 3. Anestesia local na região da exodontia.



Figs. 4. Incisão intrasulcular.



Fig. 5. Sindesmotomia e descolamento do tecido ao redor do primeiro molar inferior direito.

Para a luxação e extração do dente, foi usada espátula Holleback número 6 (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil) com o movimento de alavanca entre o primeiro e segundo molar (Figs. 6 e 7). Devido à dificuldade no momento da extração, em alguns casos, foi necessário o uso de pinças hemostáticas (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil) para remover o dente multirradicular (Fig. 8). Após a exodontia, o tecido foi suturado com fio de Nylon 5.0 (Ethicon Johnson & Johnson®, New Brunswick, New Jersey, EUA.) Em seguida, uma única dose de 30000 UI de Penicilina-G Benzatina foi administrada por via intramuscular, além de Paracetamol na concentração de 200mg/Kg.



Fig. 6. Uso da espátula de Holleback número 6 como alavanca entre o primeiro e segundo molares.

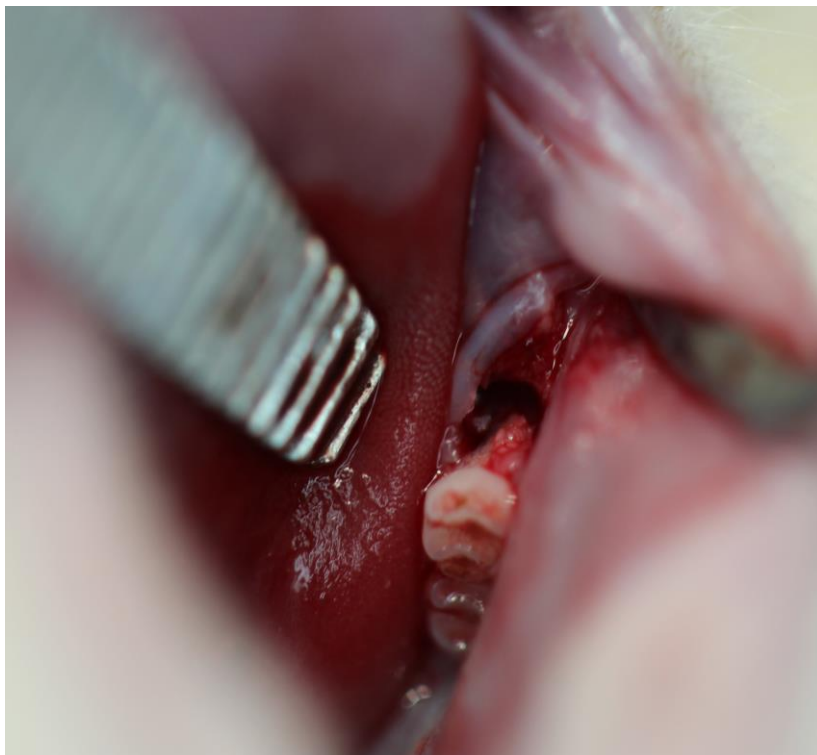


Fig. 7. Visualização do alvéolo pós-exodontia.



Fig. 8. Primeiro molar extraído.

Após 14 dias, os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos realizados anteriormente, porém do lado esquerdo. Todos passaram exatamente pelo mesmo tratamento executado do lado direito.

LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA

Para os grupos tratados com LBI, a aplicação foi feita imediatamente após a exodontia e repetida duas vezes por semana com intervalo de um dia entre elas, durante duas semanas. O protocolo de aplicação seguiu as recomendações do fabricante como indicação à bioestimulação óssea (Whitening Lase II DMC, São Carlos, São Paulo, Brasil)(Fig 10). A Potência do Laser é de 100mW e a dose aplicada foi de 3,3J utilizando a Fluência de 120J/cm e o comprimento de onda de 808nm (laser infravermelho), pelo tempo de 33 segundos.



Fig 10. Whitening laser II da DMC usado no projeto.

EUTANÁSIA

Após 28 dias da primeira cirurgia, os animais foram mortos por meio de sobredosagem de Cloridrato de Ketamina (Ketalar injetável, Achè Laboratórios Farmacêuticos S.A., Ticino, Suíça). As mandíbulas foram dissecadas, acondicionadas em frascos individuais, identificadas e fixadas em formol a 10%, regularizado para pH neutro por adição da solução tampão de fosfato (pH 7,2). Primeiramente, as peças foram submetidas à análise microtomográfica e posteriormente, foram processadas para análise histomorfométrica.

ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA

A análise microtomográfica foi realizada no Laboratório de Análise de Minerais e Rochas (LAMIR, UFPR), com a utilização do Microtomógrafo SkyScan (Bruker, modelo 1172, 2010, Kontich, Bélgica).

Cada amostra foi posicionada sobre um suporte e analisada separadamente. A voltagem da fonte foi de 89 KV e a corrente de 112 mili, com o tempo de exposição de 270

milissegundos por secção, com média de tempo total de 11 minutos para varredura de cada amostra, sendo que esta foi feita sem filtro. O tamanho de pixels usado foi de 9.02 micrometros e cada secção tomográfica teve dimensões de 1336x2000 pixels.

As imagens foram capturadas com auxílio do software NRECON v1.6.10. (Bruker, Kontich, Bélgica) (Fig. 10), no qual foi feita a reconstrução da imagem em secções transversais (Fig. 11). Todas as imagens foram ajustadas visualmente considerando brilho e contraste para padronização da cor. Com o auxílio do software CT Analyser Version: 1.9.1.0.© 2003-08 SkyScan, foi possível separar um lado da mandíbula do outro para obtenção dos resultados separadamente (Fig. 12). Após esta separação foi utilizado o software DATAViewer v1.5.2. (Bruker, Kontich, Bélgica) para a obtenção do corte sagital de cada amostra (Fig. 13). Posteriormente a imagem sagital foi analisada no software CT Analyser v1.9.1.0.© 2003-08 SkyScan, (Bruker, Kontich, Bélgica), o qual possibilitou a realização da análise quantitativa (Fig. 14).

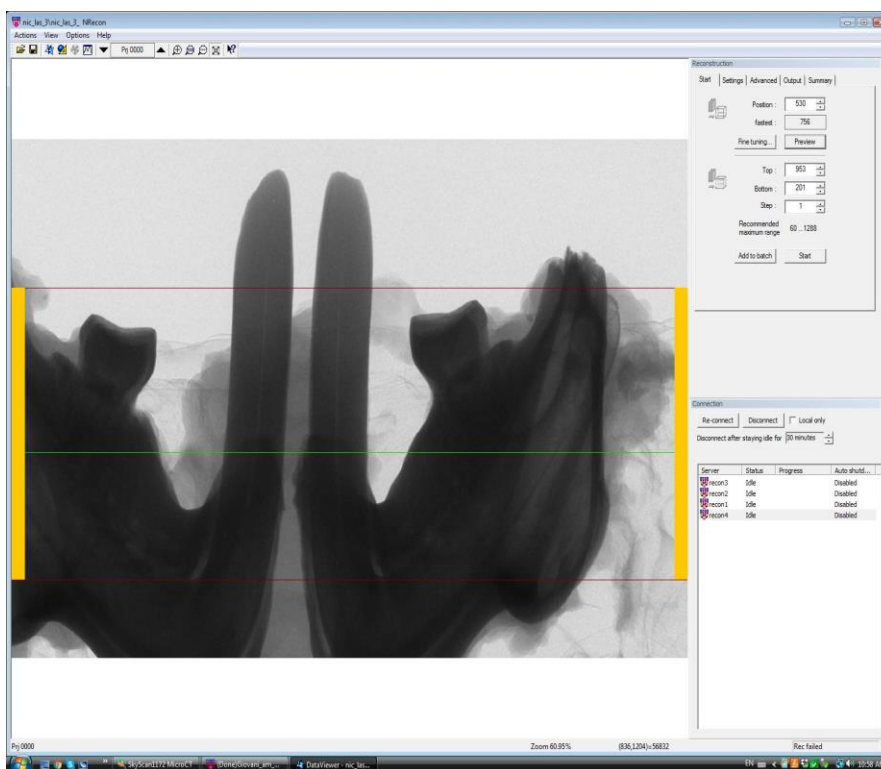


Fig. 10. Software NRECON, reconstrução da mandíbula inteira.

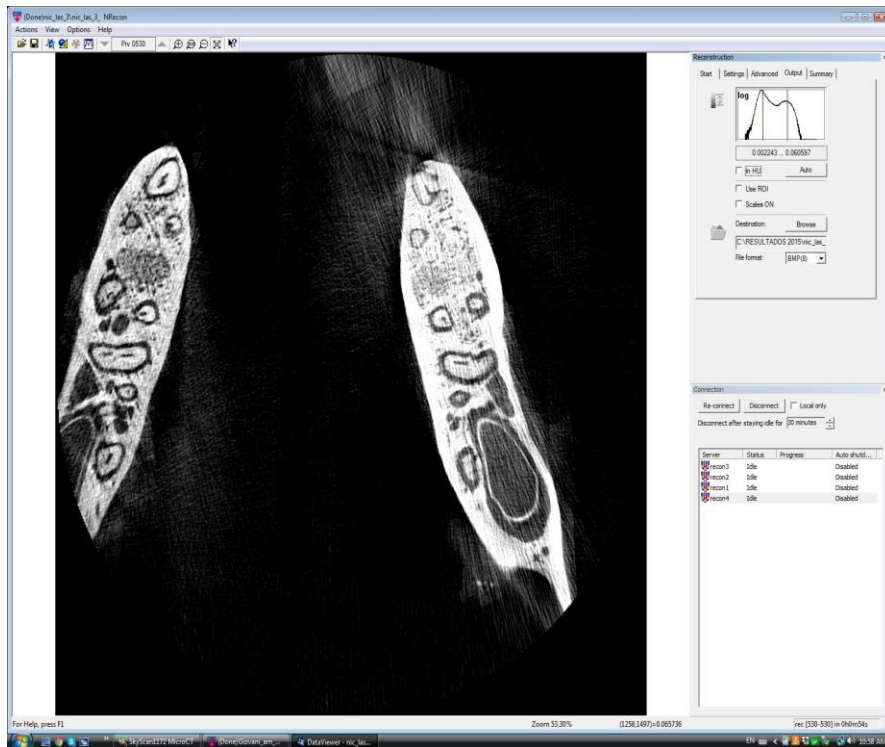


Fig 11. Software NRECON, reconstrução da imagem em seções transversais.

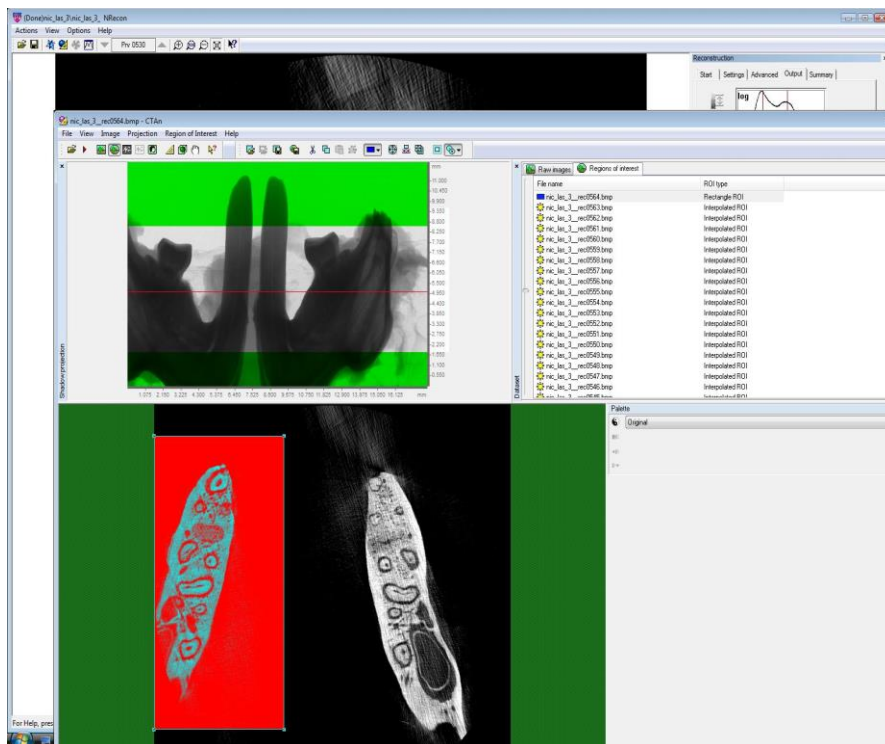


Fig. 12. Software CT Analyser v.1.9.1.0.© 2003-08 SkyScan, usado para analisar lado direito e o esquerdo de cada mandíbula separadamente.

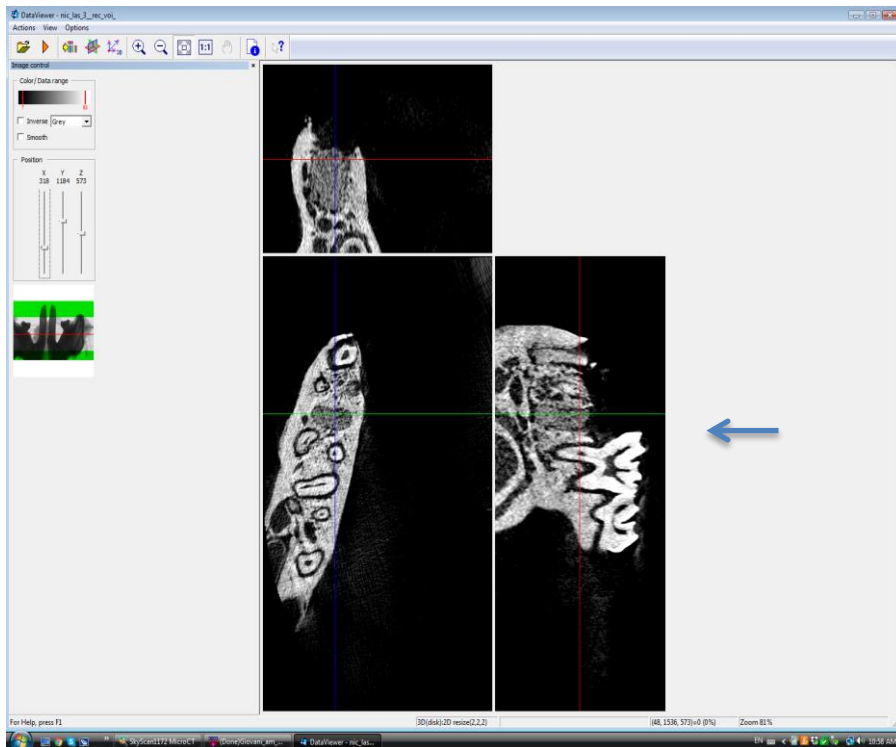


Fig. 13. Software Dataviewer. O corte utilizado para este trabalho foi o sagital (apontado com uma seta na imagem).

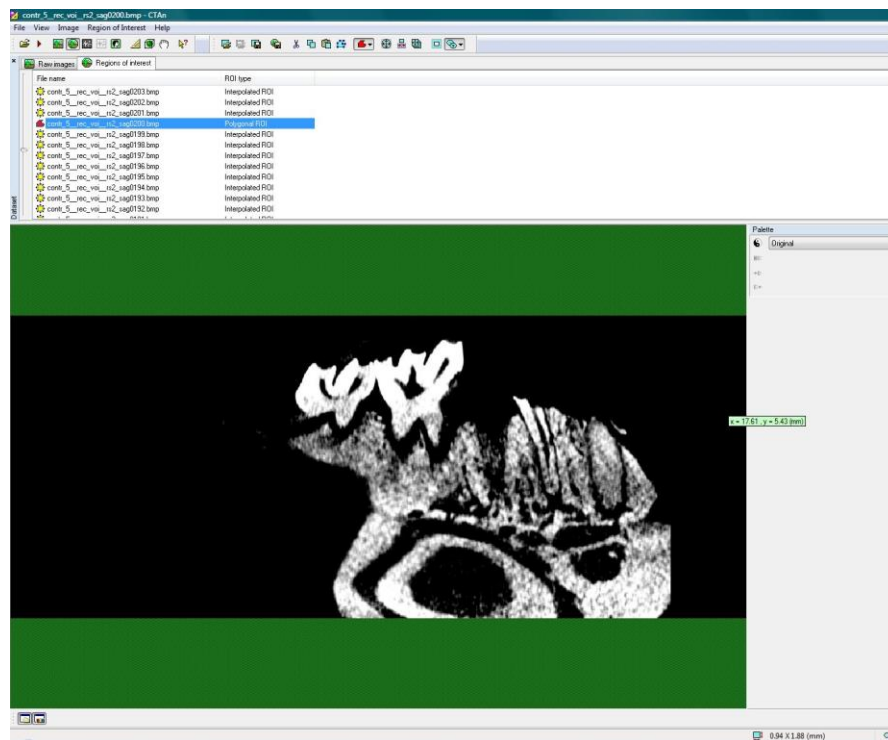


Fig. 14. Posteriormente a imagem sagital foi analisada no software CT Analyser Version: 1.9.1.0.© 2003-08 SkyScan.

A região do alvéolo da raiz distal, definida pelo espaço compreendido entre as duas cristas ósseas proximais foi delimitada nas secções tomográficas sagitais (Figs. 15 e 16)

para serem convertidas em escala de tons de cinza e pelo processo de binarização (Figs. 17 e 18) foi possível separar fases de densidade diferentes (o número de tons de cinza distinguíveis possíveis vão de 0 a 255). As binarizações em tons de cinza se deram por comparação visual direta das imagens das secções tomográficas com a escala de intensidades de cinza do software. Para a imagem com radiopacidade menor à óssea, o intervalo utilizado foi de 0 a 60, (sugerindo tecido mole e espaço vazio) (Fig. 17). O restante do intervalo de tons de cinza, para a imagem radiopaca (sugerindo tecido ósseo) foi utilizado o intervalo de tons de cinza da ordem de 61 até 255 (Fig. 18).

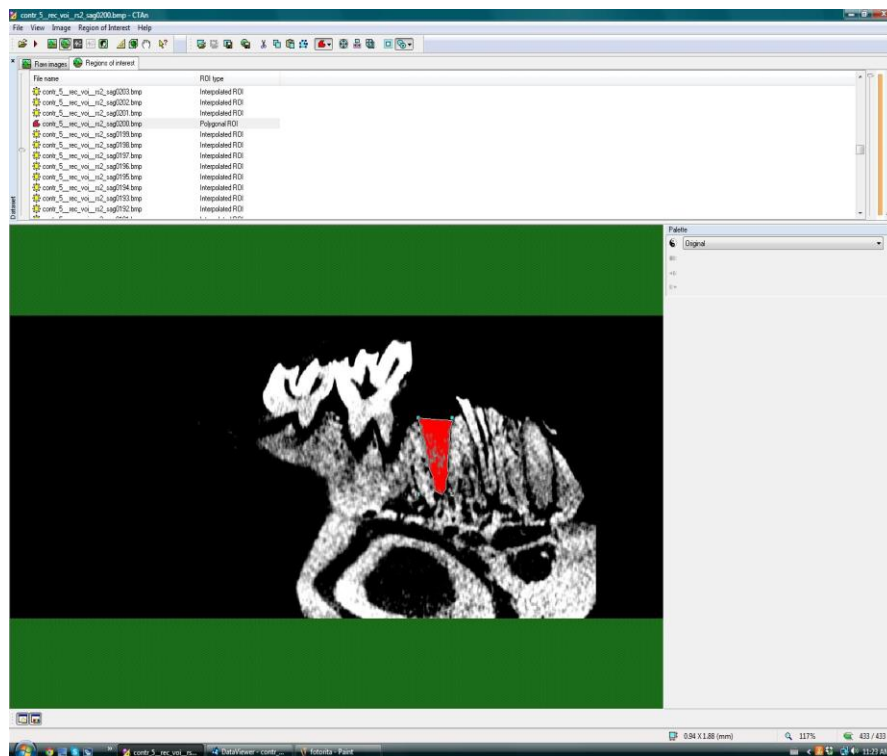


Fig. 15. Delimitação do alvéolo em todos os cortes da tomografia para obtenção do percentual de formação óssea.

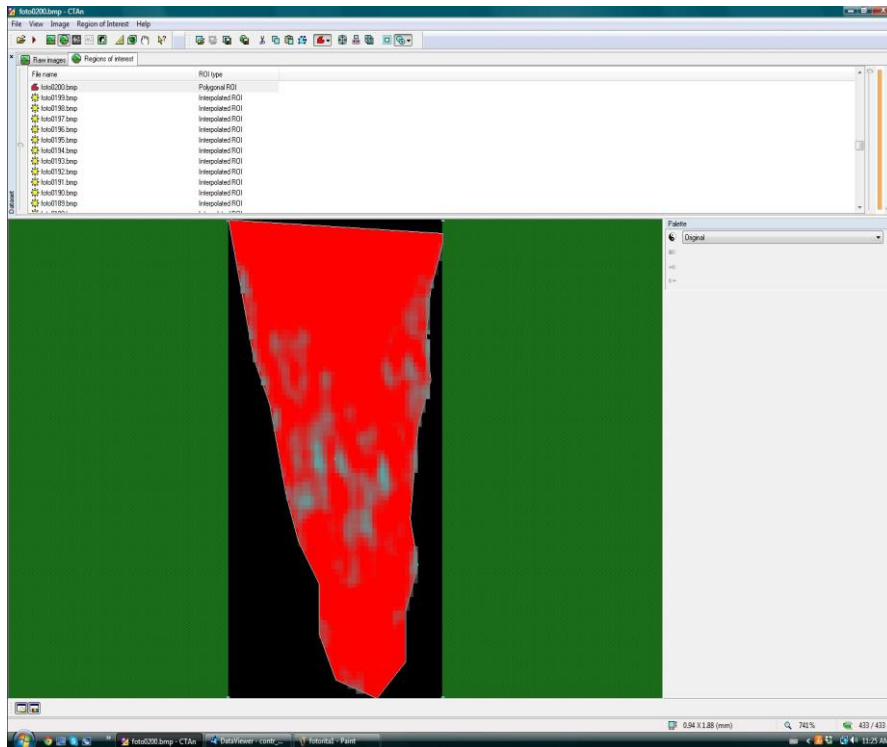


Fig. 16. Usando a escala de tons de cinza na região delimitada do alvéolo.

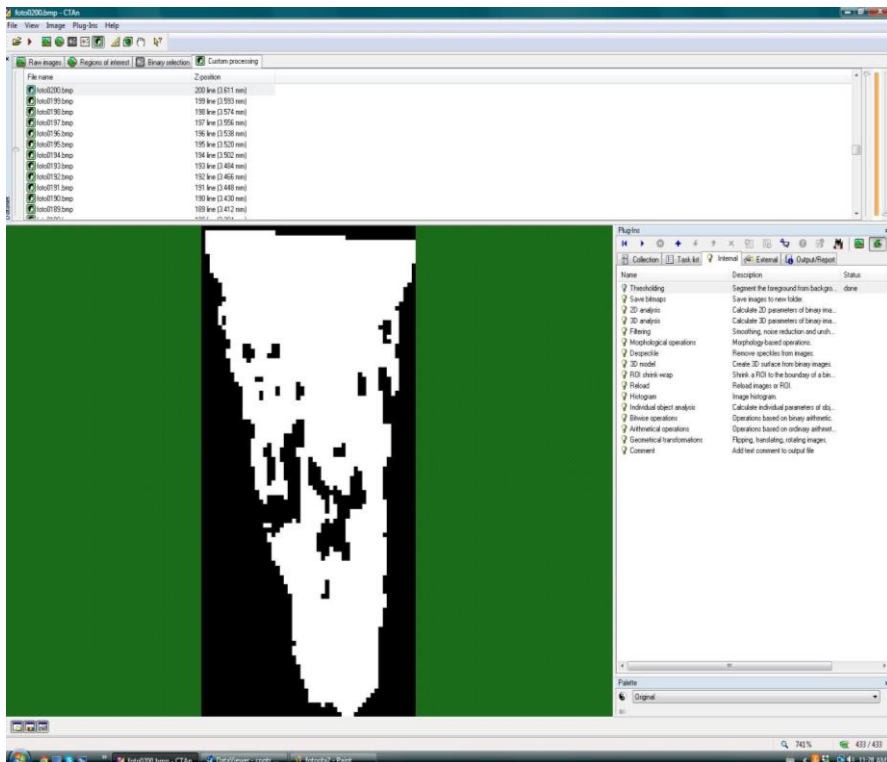


Fig. 17. Parte branca representa, na escala de cinza, o intervalo de 0-60 (sugere o espaço vazio ou tecido mole).

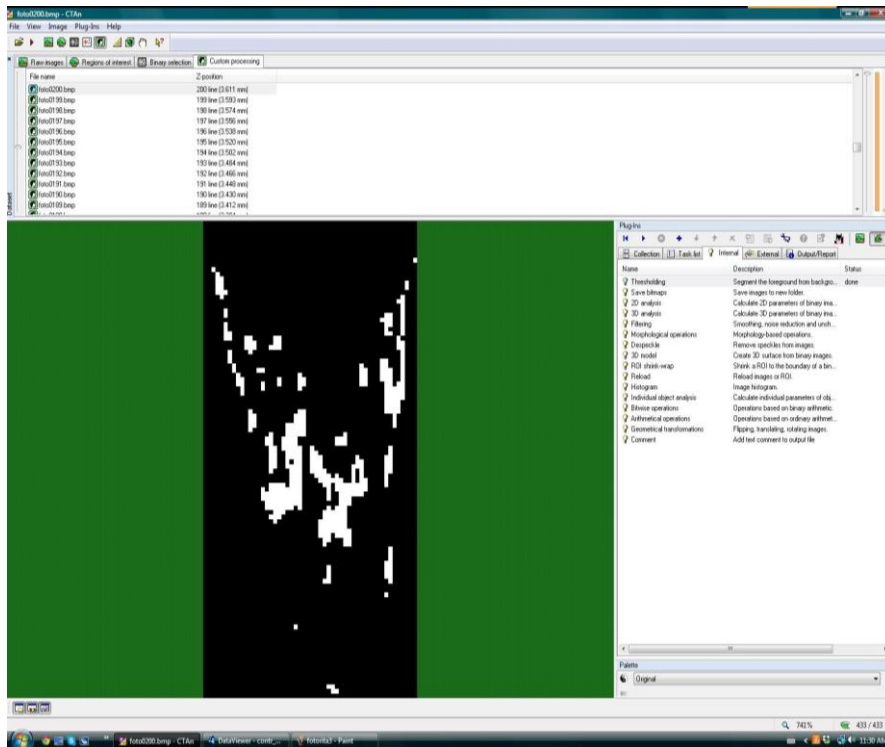


Fig. 18. Parte branca representa, na escala de cinza, o intervalo de 61-255 (sugere a formação óssea).

ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Para a análise histomorfométrica, as peças foram submetidas à descalcificação em líquido de Morse (ácido fórmico à 50% + Citrato de Sódio à 10%, 1:1), por um período de sessenta dias. Em seguida, foram incluídas em parafina (Histosec, L.C.T, S. L, Lardero, Espanha) sendo orientadas para obtenção de cortes histológicos no sentido méso-distal. Cortes semi-seriados de 5 µm de espessura foram obtidos e corados com Sirius Red.

As lâminas coradas em Sirius Red foram scaneadas no scanner Axio Scan. Z1 (Zeiss, Alemanha)(Fig. 19) na magnificação 2,5x. Uma área de aproximadamente 492189 µm² foi analisada. A porção de colágeno (tecido mole) das imagens foi removida com o auxílio do software Photoshop CS6 (Adobe, San Jose, CA, USA) (Fig. 20). As imagens finais foram abertas no software Image Pro Plus 4 (Media Cybernetics, INC. Rockville, MD, EUA).). A região do alvéolo da raiz distal, definida pelo espaço compreendido entre as duas cristas ósseas proximais foi delimitada, seguindo a metodologia preconizada por Giorgetti *et al.*²⁵. Este procedimento foi realizado em dois momentos com intervalo de 20 dias entre eles afim de calibrar o examinador. Por meio de uma máscara especialmente confeccionada para esta

leitura, os tons correspondentes ao tecido ósseo e espaço vazio foram identificados, usando a técnica de demarcação do novo osso formado desenvolvida por Barushka *et al.*²⁶(Fig. 21). Desta forma, foi obtida a porcentagem de tecido ósseo formado dentro do espaço demarcado do alvéolo.

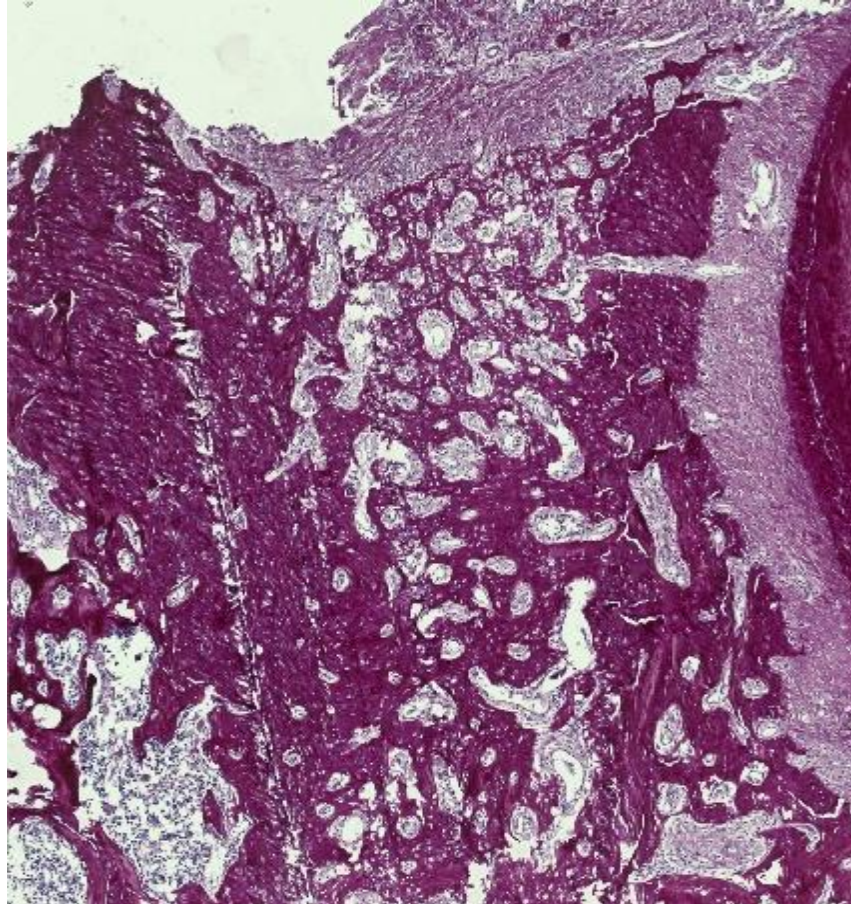


Fig. 19. Lâmina Scaneada de Sirius Red 2,5x.

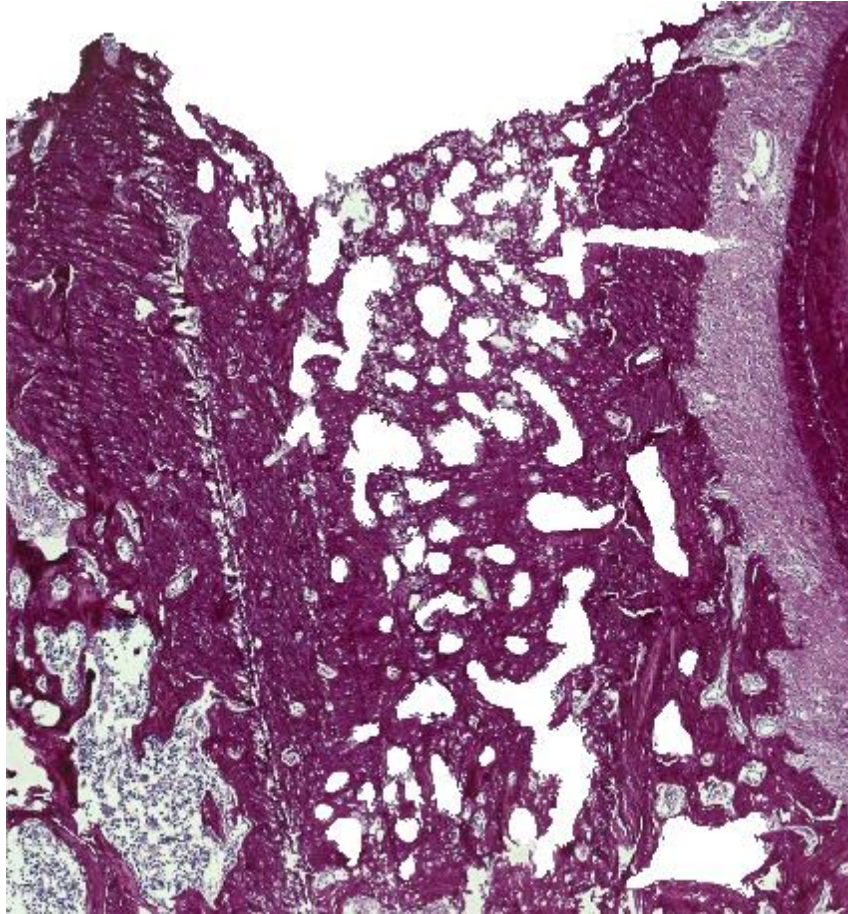


Fig. 20. Remoção do tecido conjuntivo pelo software Photoshop CS6 (Sirius Red 2,5x).

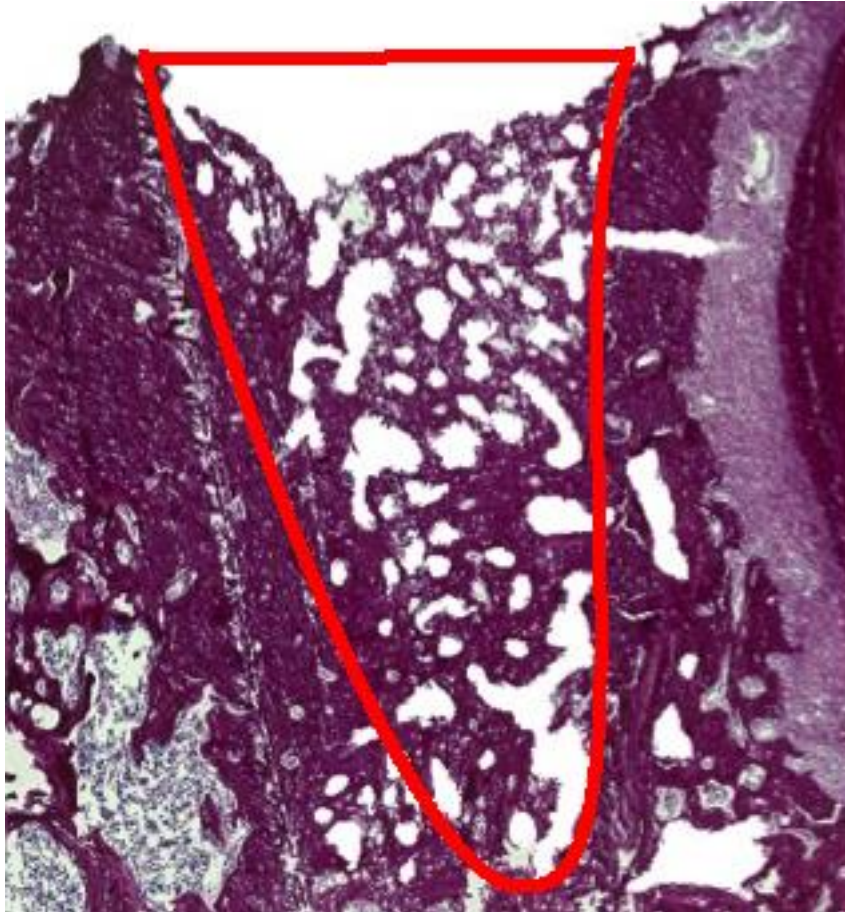


Fig. 21. Delimitação do alvéolo com o auxílio do software Image Pro Plus 4.

ANALISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise estatística foi realizada usando o programa SPSS (versão 16.0; IBM-SPSS, Armonk, NY). O Nível de significância adotado foi de 0,05. Visando comparar se existia diferença nos valores médios da porcentagem de formação óssea, considerando-se grupo e tempo, testou-se inicialmente a normalidade dos dados através do teste de normalidade de Kolmogorov Smirnov. Testou-se ainda, a homogeneidade de variâncias entre grupo e tempo por meio do teste de homogeneidade de variâncias de Levene. A comparação dos valores médios da porcentagem de formação óssea segundo grupo e tempo foi feita utilizando o método Anova a dois critérios, modelo fatorial completo. Quando Anova indicou diferenças entre grupo e entre grupo e tempo, as comparações múltiplas dois a dois foram feitas utilizando o teste de comparações múltiplas paramétricas de Tukey, que foi o que aconteceu para a variável porcentagem de formação óssea avaliada na microtomografia, uma vez que o teste de Levene indicou variâncias homogêneas entre grupo e tempo. Foi aplicado o teste de Games-Howell para variâncias heterogêneas para a variável porcentagem de formação

óssea avaliada histomorfometricamente, uma vez que o teste de homogeneidade de Levene indicou variâncias heterogêneas entre grupo e tempo.

Análise Estatística

Grupo x Tempo		Testes de Normalidade		
		Estatística	Kolmogorov-Smirnov ^a	
			gl	Valor p
Osso total Sírius Red	Controle / 14 dias	.229	8	,200 [*]
	Controle / 28 dias	.176	6	,200 [*]
	Laser / 14 dias	.193	7	,200 [*]
	Laser / 28 dias	.151	7	,200 [*]
	Nicotina / 14 dias	.233	6	,200 [*]
	Nicotina / 28 dias	.141	8	,200 [*]
	Nicotina e Laser / 14 dias	.265	6	,200 [*]
	Nicotina e laser / 28 dias	.221	9	,200 [*]
Alvéolo total Sírius Red	Controle / 14 dias	.201	8	,200 [*]
	Controle / 28 dias	.172	6	,200 [*]
	Laser / 14 dias	.166	7	,200 [*]
	Laser / 28 dias	.201	7	,200 [*]
	Nicotina / 14 dias	.236	6	,200 [*]
	Nicotina / 28 dias	.247	8	,164
	Nicotina e Laser / 14 dias	.164	6	,200 [*]
	Nicotina e laser / 28 dias	.162	9	,200 [*]
Porcentagem de osso Sírius Red	Controle / 14 dias	.155	8	,200 [*]
	Controle / 28 dias	.186	6	,200 [*]
	Laser / 14 dias	.209	7	,200 [*]
	Laser / 28 dias	.254	7	,192
	Nicotina / 14 dias	.266	6	,200 [*]
	Nicotina / 28 dias	.204	8	,200 [*]
	Nicotina e Laser / 14 dias	.173	6	,200 [*]
	Nicotina e laser / 28 dias	.216	9	,200 [*]
Porcentagem de colágeno Tipo I	Controle / 14 dias	.222	8	,200 [*]
	Controle / 28 dias	.270	6	,194
	Laser / 14 dias	.289	7	,079
	Laser / 28 dias	.248	7	,200 [*]
	Nicotina / 14 dias	.218	6	,200 [*]
	Nicotina / 28 dias	.166	8	,200 [*]
	Nicotina e Laser / 14 dias	.171	6	,200 [*]
	Nicotina e laser / 28 dias	.261	9	,077
Porcentagem de espaço vazio e tecido mole por microtomografia	Controle / 14 dias	.222	8	,200 [*]
	Controle / 28 dias	.227	6	,200 [*]
	Laser / 14 dias	.197	7	,200 [*]
	Laser / 28 dias	.123	7	,200 [*]
	Nicotina / 14 dias	.172	6	,200 [*]
	Nicotina / 28 dias	.143	8	,200 [*]
	Nicotina e Laser / 14 dias	.209	6	,200 [*]
	Nicotina e laser / 28 dias	.199	9	,200 [*]
Porcentagem de osso total por microtomografia	Controle / 14 dias	.222	8	,200 [*]
	Controle / 28 dias	.227	6	,200 [*]
	Laser / 14 dias	.197	7	,200 [*]
	Laser / 28 dias	.123	7	,200 [*]
	Nicotina / 14 dias	.172	6	,200 [*]
	Nicotina / 28 dias	.143	8	,200 [*]
	Nicotina e Laser / 14 dias	.209	6	,200 [*]
	Nicotina e laser / 28 dias	.199	9	,200 [*]

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Descritivas

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
						Limite inferior	Limite superior		
Osso total Sirius Red	Controle	14	813147.36	142447.53	38070.70	530900.60	895394.11	409052.06	805190.06
	Laser	14	807116.03	141449.97	37804.10	725445.25	888786.81	437865.50	976819.81
	Nicotina	14	680410.31	161694.32	43214.62	567050.78	753769.83	459567.56	986745.94
	Nicotina e Laser	15	753915.32	151678.68	39163.27	669918.47	837912.17	552439.19	1014627.50
	Total	57	709441.43	164347.93	21768.42	665834.05	753048.80	409052.06	1014627.50
Alveolo total Sirius Red	Controle	14	1014033.75	201717.30	53911.22	897565.65	1130501.85	779231.40	1362073.00
	Laser	14	1058151.12	112368.20	30031.66	993271.66	1123030.59	817363.00	1223799.00
	Nicotina	14	1179278.84	158400.01	42334.18	1087821.39	1270736.28	791339.69	1374615.30
	Nicotina e Laser	15	1087390.77	100009.39	25822.31	1032007.42	1142774.13	944125.10	1273291.90
	Total	57	1084760.59	156092.83	20675.00	1043343.59	1126177.59	779231.40	1374615.30
Percentagem de osso Sirius Red	Controle	14	60.67	10.37	2.77	54.68	66.66	50.83	87.32
	Laser	14	78.20	5.22	1.40	75.18	81.21	67.87	89.14
	Nicotina	14	56.11	11.10	2.97	49.70	62.52	38.75	71.78
	Nicotina e Laser	15	69.24	11.34	2.93	62.96	75.52	49.28	82.43
	Total	57	66.11	12.79	1.69	62.72	69.50	38.75	89.14
Percentagem de colágeno Tipo I	Controle	14	2.24	2.54	0.68	0.77	3.71	0.03	8.37
	Laser	14	1.32	1.20	0.32	0.63	2.02	0.06	3.16
	Nicotina	14	2.61	1.64	0.44	1.66	3.55	0.07	5.33
	Nicotina e Laser	15	1.55	1.13	0.29	0.92	2.18	0.08	4.34
	Total	57	1.92	1.75	0.23	1.46	2.39	0.03	8.37
Percentagem de espaço vazio e tecido mole por microtomografia	Controle	14	25.52	13.12	3.51	17.94	33.09	4.60	43.58
	Laser	14	18.41	12.55	3.36	11.16	25.66	1.34	34.73
	Nicotina	14	43.98	18.87	5.04	33.09	54.87	18.84	78.53
	Nicotina e Laser	15	20.60	12.80	3.30	13.52	27.69	4.14	43.67
	Total	57	27.01	17.38	2.30	22.40	31.62	1.34	78.53
Percentagem de osso total por microtomografia	Controle	14	74.48	13.12	3.51	66.91	82.06	56.42	95.40
	Laser	14	81.59	12.55	3.36	74.34	88.84	65.27	98.66
	Nicotina	14	56.02	18.87	5.04	45.13	66.91	21.47	81.16
	Nicotina e Laser	15	79.40	12.80	3.30	72.31	86.48	56.33	95.86
	Total	57	72.99	17.38	2.30	68.38	77.60	21.47	98.66

Teste de Homogeneidade de Variâncias

	Estadística de Levene	gl1	gl2	Valor p
Osso total Sirius Red	.298	3	53	0.82700
Alvéolo total Sirius Red	2.300	3	53	0.08786
Percentagem de osso Sirius Red	3.824	3	53	0.01489
Percentagem de colágeno Tipo I	4.102	3	53	0.01085
Percentagem de espaço vazio e tecido mole por microtomografia	1.891	3	53	0.14227
Percentagem de osso total por microtomografia	1.891	3	53	0.14227

Descritivas

Variável	Tempo	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
						Limite inferior	Limite superior		
Osso total Sirius Red	14 dias	27	610651.09	140473.70	27034.18	555081.54	666220.63	409052.06	922360.75
	28 dias	30	798352.74	131156.04	23945.71	749378.27	847327.21	482148.38	1014627.50
	Total	57	709441.43	164347.93	21768.42	665834.05	753048.80	409052.06	1014627.50
Alveolo total Sirius Red	14 dias	27	1068642.14	171645.55	33033.20	1000741.43	1136542.86	779231.40	1362073.00
	28 dias	30	1099267.19	142040.96	25933.01	1046228.22	1152306.15	791339.69	1374615.30
	Total	57	1084760.59	156092.83	20675.00	1043343.59	1126177.59	779231.40	1374615.30
Percentagem de osso Sirius Red	14 dias	27	58.16	11.55	2.22	53.59	62.73	38.75	79.67
	28 dias	30	73.26	9.20	1.68	69.83	76.70	55.78	89.14
	Total	57	66.11	12.79	1.69	62.72	69.50	38.75	89.14
Percentagem de colágeno Tipo I	14 dias	27	2.19	2.11	0.41	1.36	3.03	0.03	8.37
	28 dias	30	1.68	1.33	0.24	1.18	2.18	0.07	5.23
	Total	57	1.92	1.75	0.23	1.46	2.39	0.03	8.37
Percentagem de espaço vazio e tecido mole por microtomografia	14 dias	27	39.00	15.44	2.97	32.89	45.10	12.97	78.53
	28 dias	30	16.23	10.76	1.96	12.21	20.24	1.34	39.47
	Total	57	27.01	17.38	2.30	22.40	31.62	1.34	78.53
Percentagem de osso total por microtomografia	14 dias	27	61.00	15.44	2.97	54.90	67.11	21.47	87.03
	28 dias	30	83.77	10.76	1.96	79.76	87.79	60.53	98.66
	Total	57	72.99	17.38	2.30	68.38	77.60	21.47	98.66

Teste de Homogeneidade de Variâncias

	Estadística de Levene	gl1	gl2	Valor p
Osso total Sirius Red	.448	1	55	0.50610
Alvéolo total Sirius Red	1.473	1	55	0.23008
Percentagem de osso Sirius Red	1.178	1	55	0.28242
Percentagem de colágeno Tipo I	4.425	1	55	0.04000
Percentagem de espaço vazio e tecido mole por microtomografia	1.574	1	55	0.21495
Percentagem de osso total por microtomografia	1.574	1	55	0.21495

Descritivas

Variável	Grupo x Tempo	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
						Limite inferior	Limite superior		
Osso total Sirius Red	Controle / 14 dias	8	540522.49	137412.71	48582.73	425642.59	655402.39	408052.06	791397.38
	Controle / 28 dias	6	709980.50	81432.42	33244.65	624522.42	795438.58	609683.75	805190.06
	Laser / 14 dias	7	745553.76	160298.53	60587.15	597302.35	893805.18	437865.50	922360.75
	Laser / 28 dias	7	868678.29	93872.91	35480.62	781860.33	955496.26	717894.00	976819.81
	Nicotina / 14 dias	6	543359.13	51979.75	21220.64	488809.73	597908.52	459567.56	611207.31
	Nicotina / 28 dias	8	748198.69	161473.55	57089.52	613203.43	883193.95	482148.38	986745.94
	Nicotina e Laser / 14 dias	6	614061.39	62001.74	25312.10	548994.56	679128.22	552439.19	701877.50
	Nicotina e laser / 28 dias	9	847151.27	115800.26	38600.09	758139.31	936163.24	698291.81	1014627.50
	Total	57	709441.43	164347.93	21768.42	665834.05	753048.80	408052.06	1014627.50
Alvéolo total Sirius Red	Controle / 14 dias	8	988604.33	226920.53	80228.52	798894.01	1178314.64	779231.40	1362073.00
	Controle / 28 dias	6	1047939.65	176888.05	72214.25	862307.02	1233572.28	853204.88	1349453.80
	Laser / 14 dias	7	1029372.89	143599.49	54275.50	896565.51	1162180.26	817363.00	1223799.00
	Laser / 28 dias	7	1086929.36	69313.85	26198.17	1022824.74	1151033.98	975380.60	1205736.40
	Nicotina / 14 dias	6	1214246.75	97527.52	39815.44	1111897.90	1316595.60	1077685.50	1336699.80
	Nicotina / 28 dias	8	1153052.91	194855.38	68891.78	990149.73	1315956.08	791339.69	1374615.30
	Nicotina e Laser / 14 dias	6	1075568.77	94602.92	38621.48	976289.09	1174848.44	944125.10	1226111.90
	Nicotina e laser / 28 dias	9	1095272.11	108328.28	36109.43	1012003.63	1178540.59	979262.89	1273291.90
	Total	57	1084760.59	156092.83	20675.00	1043343.59	1126177.59	779231.40	1374615.30
Percentagem de osso Sirius Red	Controle / 14 dias	8	54.51	2.72	0.96	52.24	56.79	50.83	58.10
	Controle / 28 dias	6	68.89	11.30	4.61	57.03	80.74	55.78	87.32
	Laser / 14 dias	7	74.48	3.84	1.45	70.92	78.03	67.87	79.67
	Laser / 28 dias	7	81.92	3.46	1.31	78.73	85.12	79.22	89.14
	Nicotina / 14 dias	6	44.81	3.51	1.43	41.13	48.50	38.75	49.31
	Nicotina / 28 dias	8	64.58	5.34	1.89	60.11	69.05	56.27	71.78
	Nicotina e Laser / 14 dias	6	57.35	6.70	2.74	50.32	64.38	49.28	68.82
	Nicotina e laser / 28 dias	9	77.16	4.52	1.51	73.89	80.64	70.02	82.43
	Total	57	66.11	12.79	1.69	62.72	69.50	38.75	89.14
Percentagem de colágeno Tipo I	Controle / 14 dias	8	2.59	3.03	1.07	0.05	5.12	0.03	8.37
	Controle / 28 dias	6	1.78	1.86	0.76	-0.18	3.73	0.08	4.20
	Laser / 14 dias	7	0.78	1.11	0.42	-0.25	1.81	0.06	3.10
	Laser / 28 dias	7	1.86	1.10	0.42	0.85	2.88	0.33	3.16
	Nicotina / 14 dias	6	3.27	1.59	0.65	1.60	4.93	1.44	5.33
	Nicotina / 28 dias	8	2.11	1.59	0.56	0.78	3.44	0.07	5.23
	Nicotina e Laser / 14 dias	6	2.25	1.36	0.55	0.82	3.67	0.50	4.34
	Nicotina e laser / 28 dias	9	1.09	0.71	0.24	0.55	1.63	0.08	2.56
	Total	57	1.92	1.75	0.23	1.46	2.39	0.03	8.37
Percentagem de espaço vazio e tecido mole por microtomografia	Controle / 14 dias	8	33.99	9.80	3.46	25.80	42.18	12.97	43.58
	Controle / 28 dias	6	14.21	6.68	2.73	7.20	21.22	4.60	24.77
	Laser / 14 dias	7	29.96	4.09	1.55	26.17	33.74	22.24	34.73
	Laser / 28 dias	7	6.86	3.68	1.39	3.46	10.26	1.34	12.65
	Nicotina / 14 dias	6	62.50	11.44	4.67	50.50	74.51	48.57	78.53
	Nicotina / 28 dias	8	30.09	7.27	2.57	24.01	36.17	18.84	39.47
	Nicotina e Laser / 14 dias	6	32.71	9.43	3.85	22.81	42.61	20.94	43.67
	Nicotina e laser / 28 dias	9	12.53	6.91	2.30	7.22	17.84	4.14	24.16
	Total	57	27.01	17.38	2.30	22.40	31.62	1.34	78.53
Percentagem de osso total por microtomografia	Controle / 14 dias	8	66.01	9.80	3.46	57.82	74.20	56.42	87.03
	Controle / 28 dias	6	85.79	6.68	2.73	78.78	92.80	75.23	95.40
	Laser / 14 dias	7	70.04	4.09	1.55	66.26	73.83	65.27	77.76
	Laser / 28 dias	7	93.14	3.68	1.39	89.74	96.54	87.35	98.66
	Nicotina / 14 dias	6	37.50	11.44	4.67	25.49	49.50	21.47	51.43
	Nicotina / 28 dias	8	69.91	7.27	2.57	63.83	75.99	60.53	81.16
	Nicotina e Laser / 14 dias	6	67.29	9.43	3.85	57.39	77.19	56.33	79.06
	Nicotina e laser / 28 dias	9	87.47	6.91	2.30	82.16	92.78	75.84	95.86
	Total	57	72.99	17.38	2.30	68.38	77.60	21.47	98.66

Teste de Homogeneidade de Variâncias

	Estadística de Levene	gl1	gl2	Valor p
Osso total Sirius Red	1.403	7	49	0.22554
Alvéolo total Sirius Red	1.919	7	49	0.08658
Percentagem de osso Sirius Red	2.441	7	49	0.03148
Percentagem de colágeno Tipo I	3.470	7	49	0.00427
Percentagem de espaço vazio e tecido mole por microtomografia	1.468	7	49	0.20085
Percentagem de osso total por microtomografia	1.468	7	49	0.20085

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: Osso total Sirius Red

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Valor p	Poder observado ^a
GrupoxTempo	817671078425.844	7	116810154060.835	8.237	0.00000	0.99995
Erro	694902509613.908	49	14181683869.672			
Total corrigido	1512573588039.750	56				

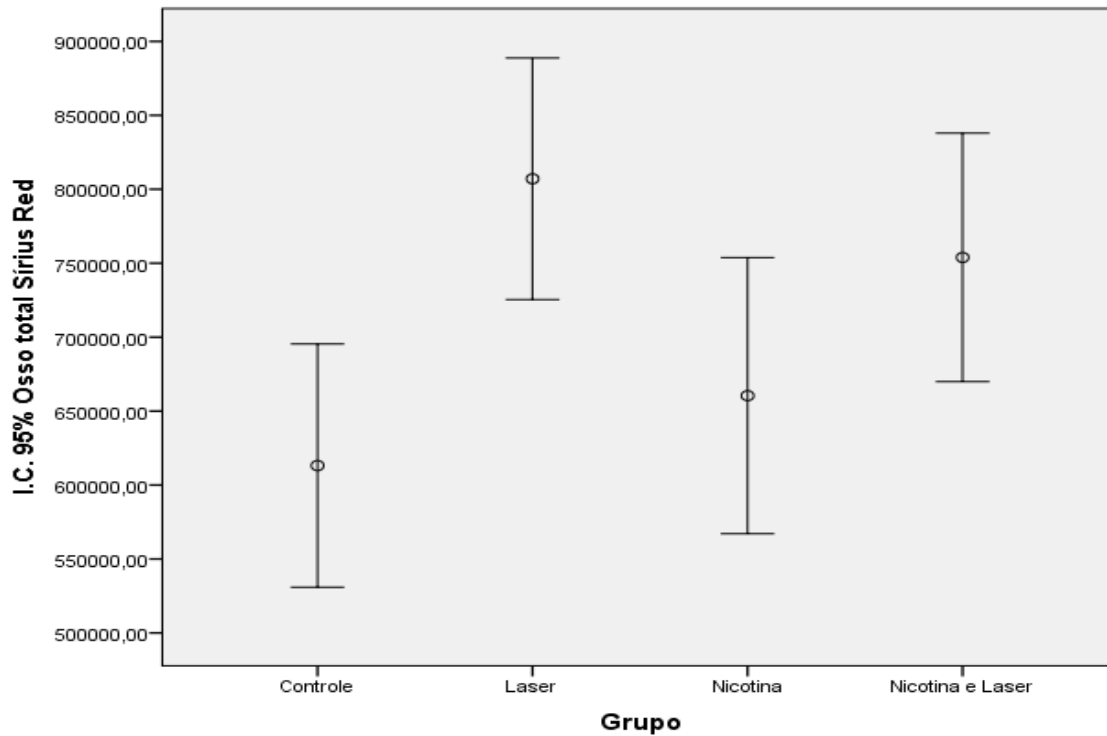
b. Calculado usando alfa = ,05

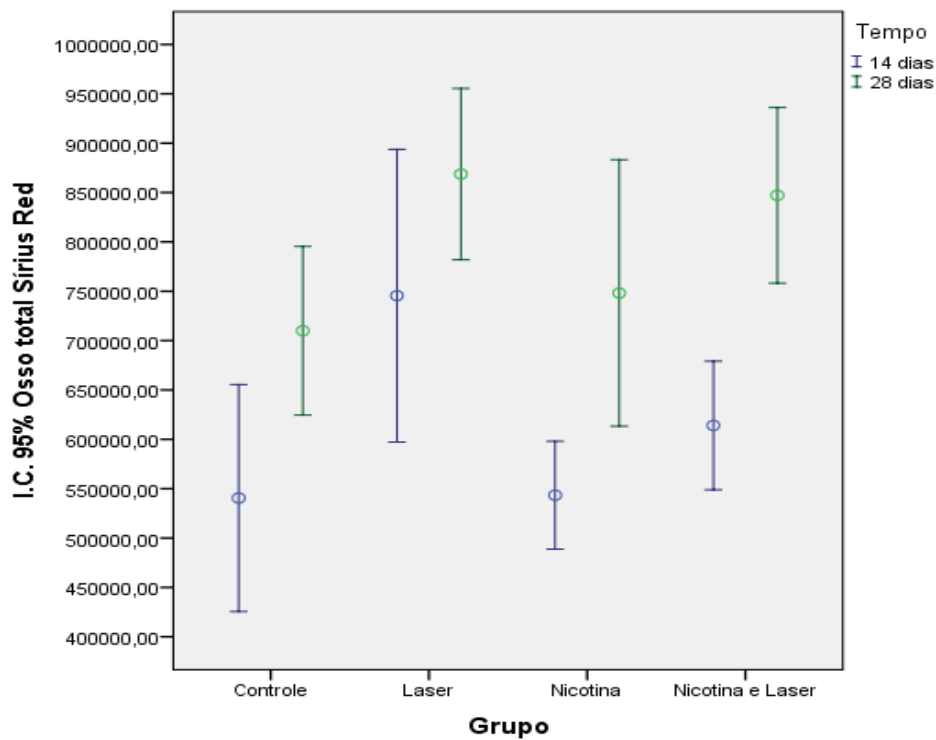
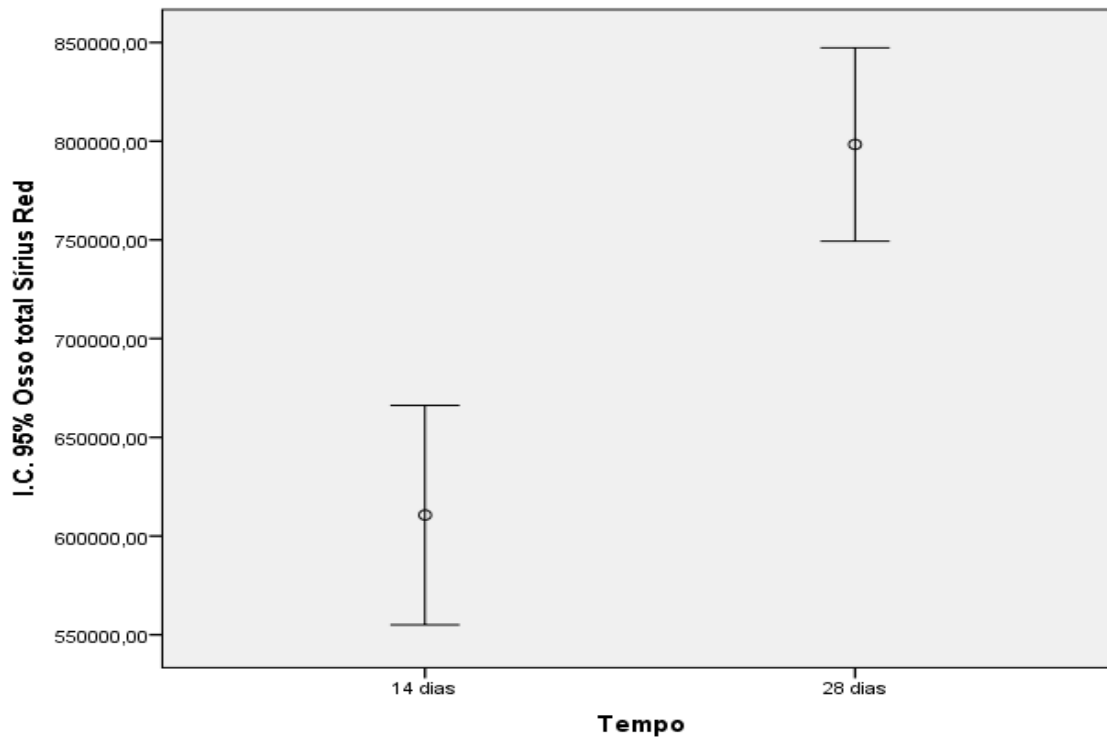
Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: Osso total Sirius Red

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Valor p	Poder observado ^a
Grupo	290540697274.961	3	96846899091.654	6.829	0.00062	0.96716
Tempo	465326087453.315	1	465326087453.315	32.812	0.00000	0.99987
Grupo * Tempo	23844159399.258	3	7948053133.086	.560	0.64367	0.15710
Erro	694902509613.908	49	14181683869.672			
Total corrigido	1512573588039.750	56				

b. Calculado usando alfa = ,05





Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: Alvéolo total Sirius Red								
Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Valor p	Poder observado ^a		
Grupo	185632932529.282	3	61877644176.427	2.70373	0.05036	0.64926		
Tempo	4957472399.468	1	4957472399.468	0.21662	0.64369	0.07418		
Grupo * Tempo	32832236166.536	3	10944078722.179	0.47820	0.69892	0.13971		
Erro	1121415853676.510	49	22886037830.133					
Total corrigido	1364438353425.430	56						

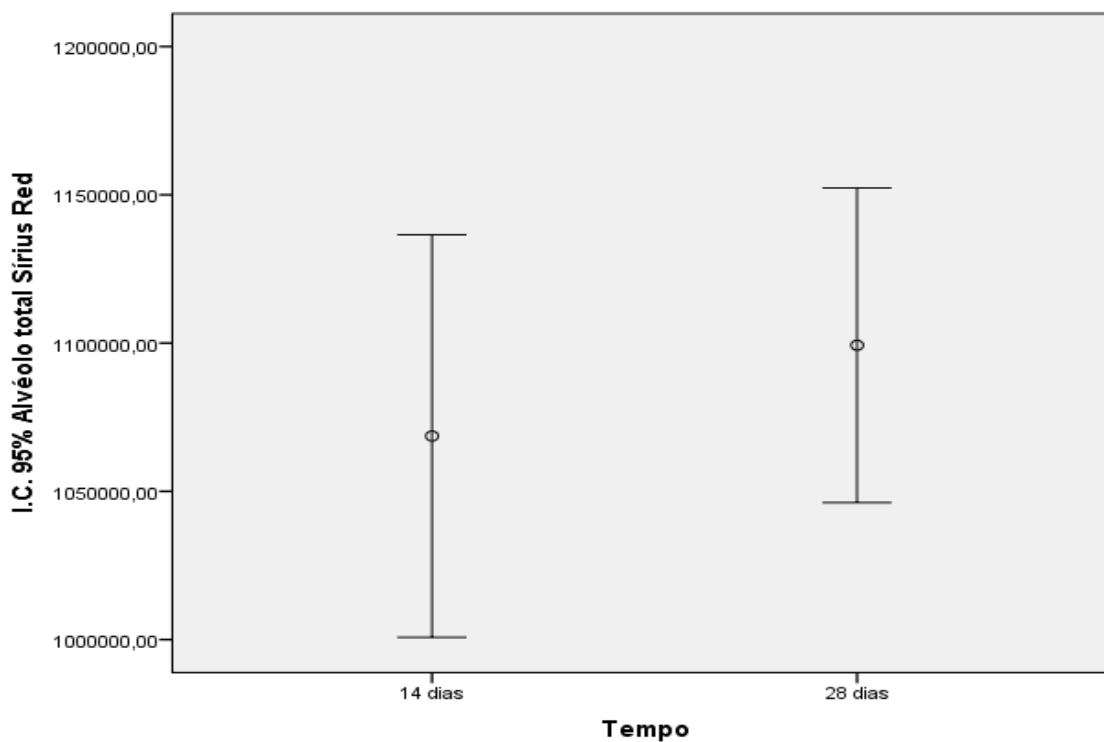
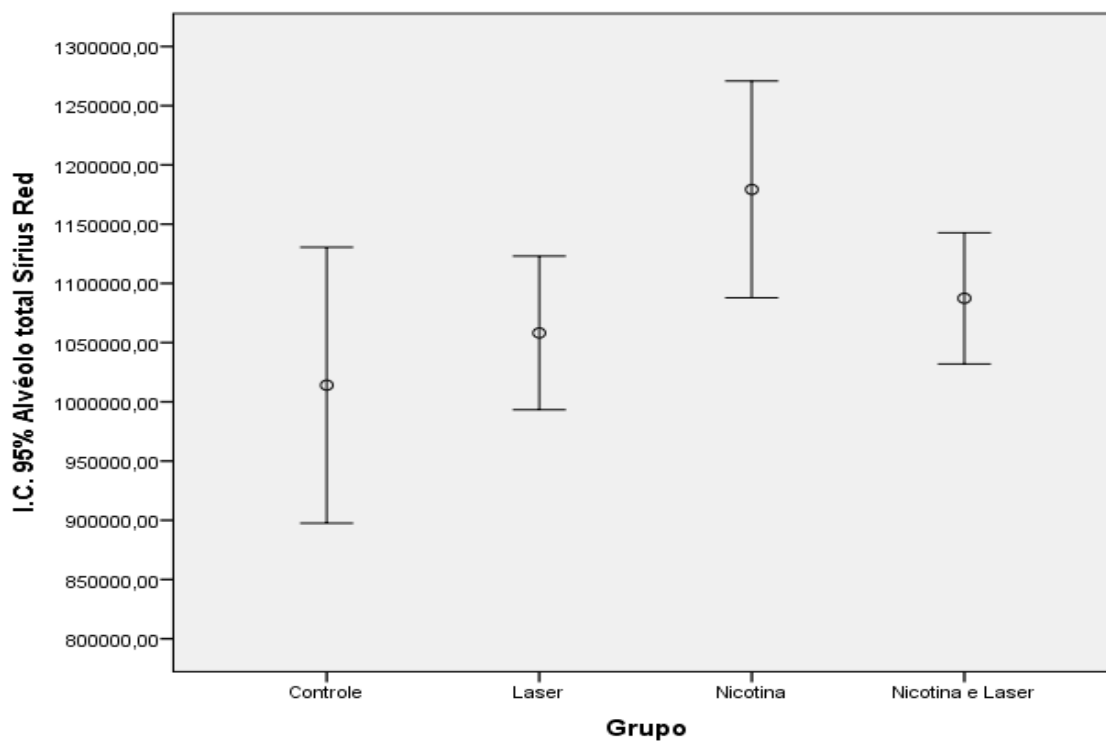
b. Calculado usando alfa = ,05

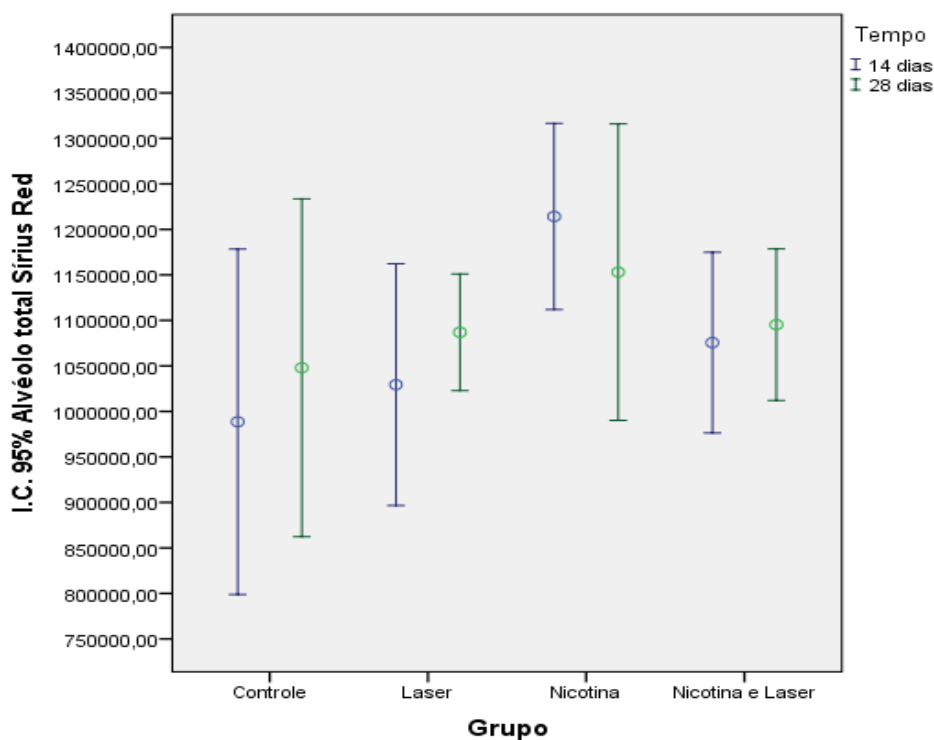
Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: Alvéolo total Sirius Red

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Valor p	Poder observado ^a
Grupoxtempo	243022499748.923	7	34717499964.132	1.517	0.18372	0.57358
Erro	1121415853676.510	49	22886037830.133			
Total corrigido	1364438353425.430	56				

b. Calculado usando alfa = ,05





Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: Percentagem de osso Sirius Red

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Valor p	Poder observado ^a
Grupo	4100.779	3	1366.926	44.665	0.00000	1.00000
Tempo	3287.821	1	3287.821	107.431	0.00000	1.00000
Grupo * Tempo	360.489	3	120.163	3.926	0.01371	0.79883
Erro	1499.596	49	30.604			
Total corrigido	9162.421	56				

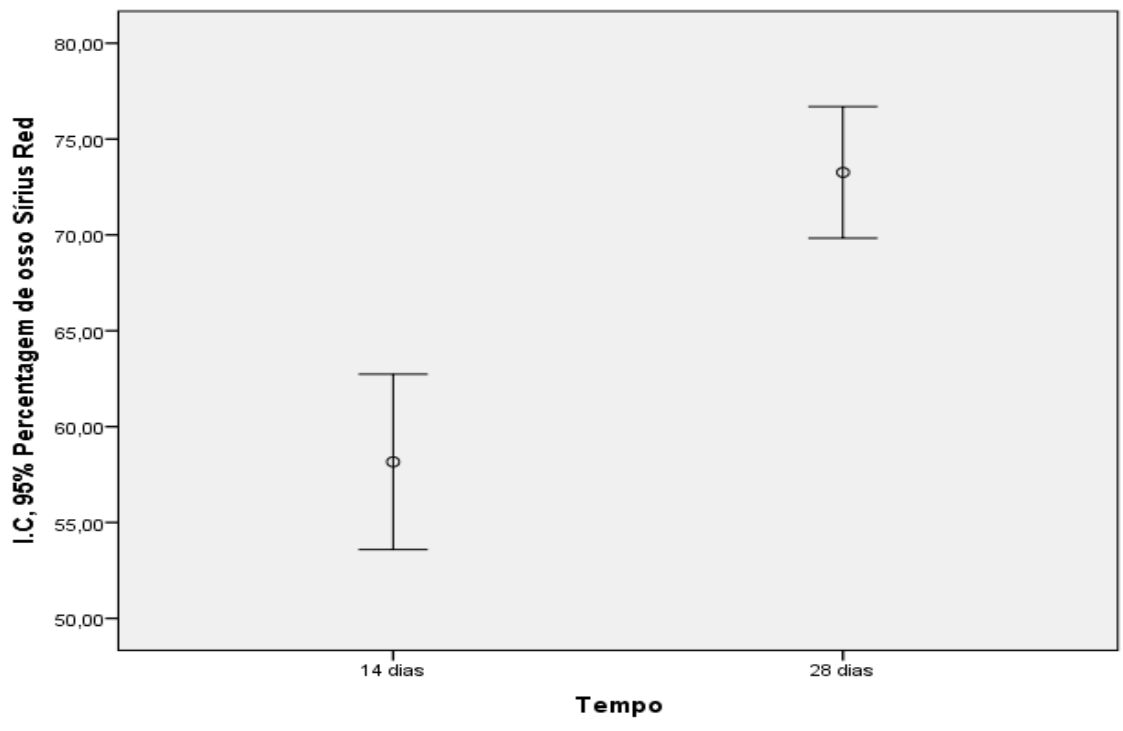
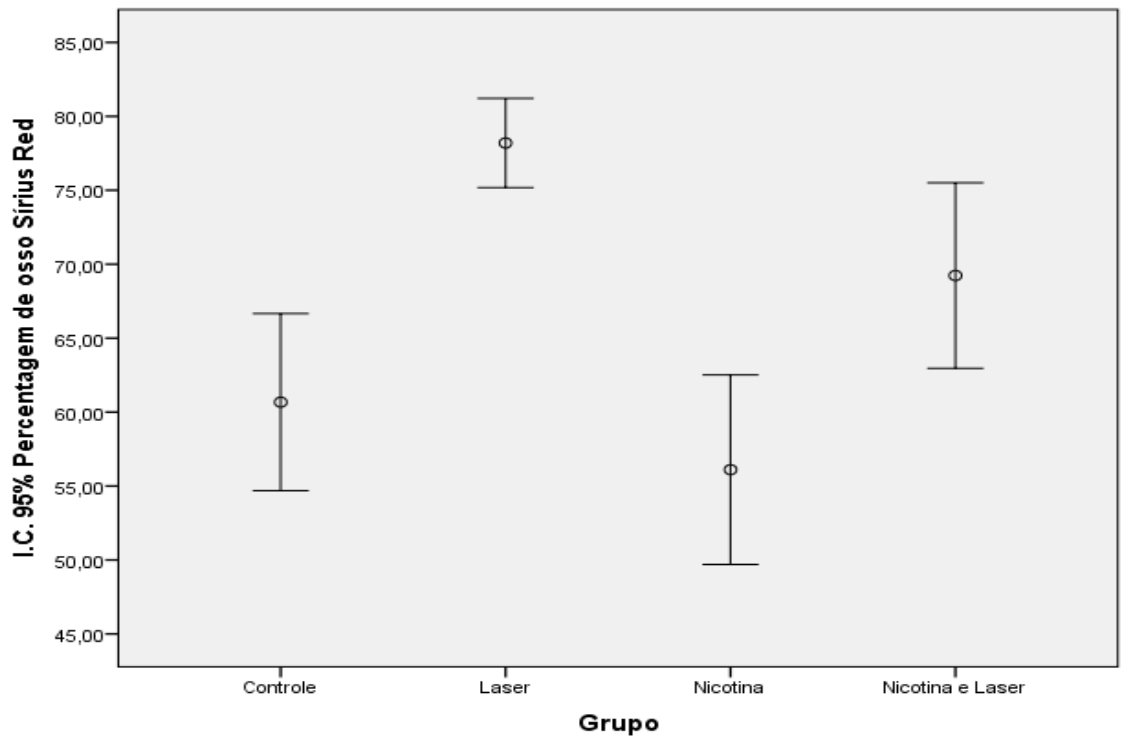
b. Calculado usando alfa = ,05

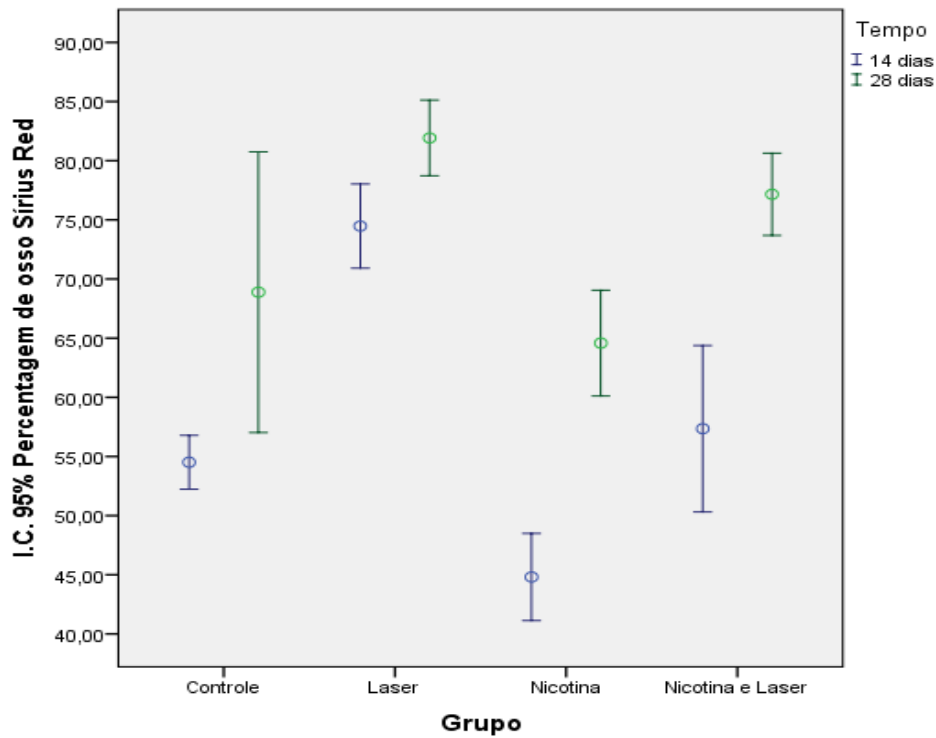
Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: Percentagem de osso Sirius Red

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Valor p	Poder observado ^a
Intercepto	239148.269	1	239148.269	7814.283	0.00000	1.00000
GrupoxTempo	7662.826	7	1094.689	35.769	0.00000	1.00000
Erro	1499.596	49	30.604			
Total corrigido	9162.421	56				

b. Calculado usando alfa = ,05





Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: Percentagem de colágeno Tipo I

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Valor p	Poder observado ^a
Grupo	14,868	3	4,956	1,735	0,17205	0,42513
Tempo	3,611	1	3,611	1,264	0,26635	0,19666
Grupo * Tempo	12,108	3	4,036	1,413	0,25020	0,35159
Erro	139,962	49	2,856			
Total corrigido	170,727	56				

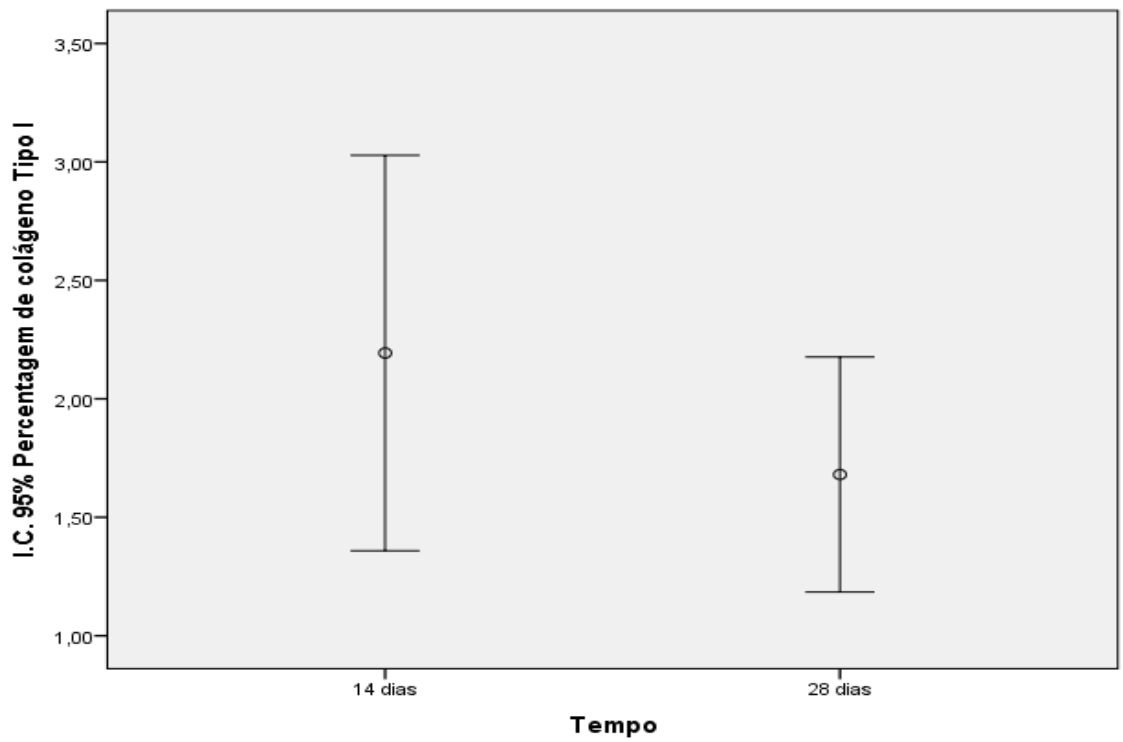
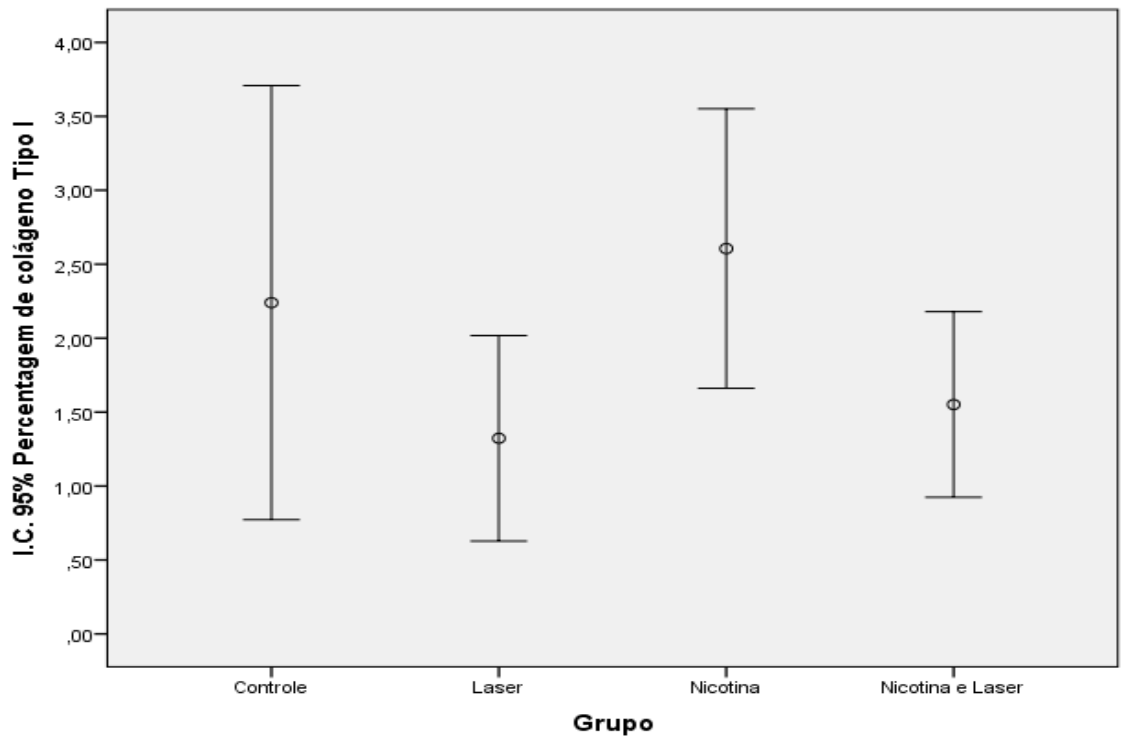
b. Calculado usando alfa = ,05

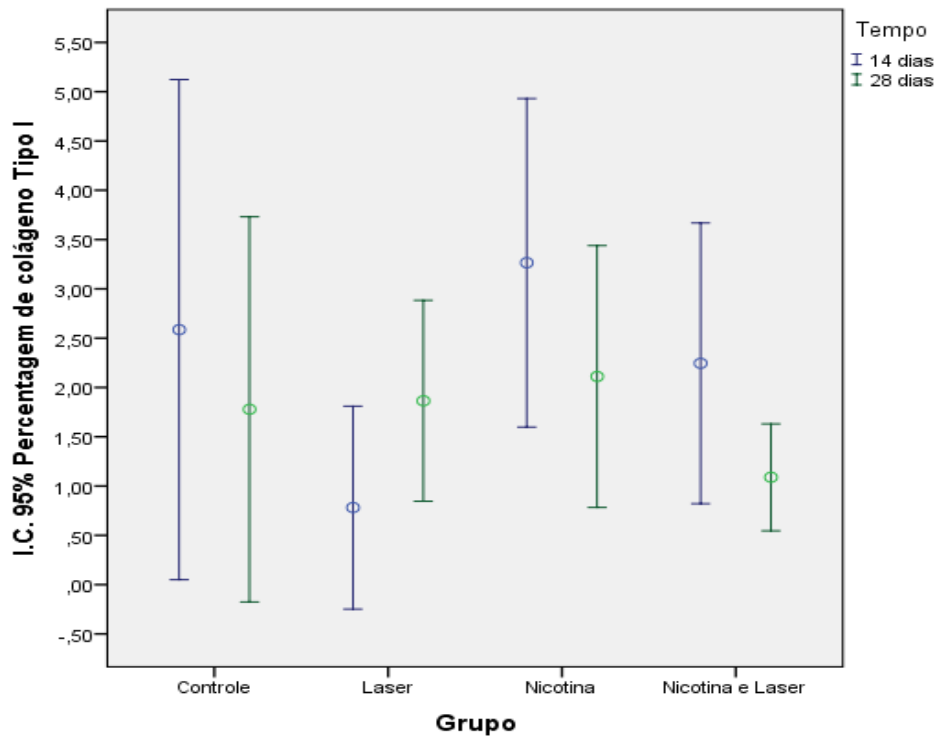
Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: Percentagem de colágeno Tipo I

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Valor p	Poder observado ^a
GrupoxTempo	30,764	7	4,395	1,539	0,17660	0,58084
Erro	139,962	49	2,856			
Total corrigido	170,727	56				

b. Calculado usando alfa = ,05





Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: Percentagem de espaço vazio e tecido mole por microtomografia

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Valor p	Poder observado ^a
Grupo	6500.392	3	2166.797	36.266	0.00000	1.00000
Tempo	7948.334	1	7948.334	133.034	0.00000	1.00000
Grupo * Tempo	358.857	3	119.619	2.002	0.12592	0.48371
Erro	2927.583	49	59.747			
Total corrigido	16920.335	56				

b. Calculado usando alfa = ,05

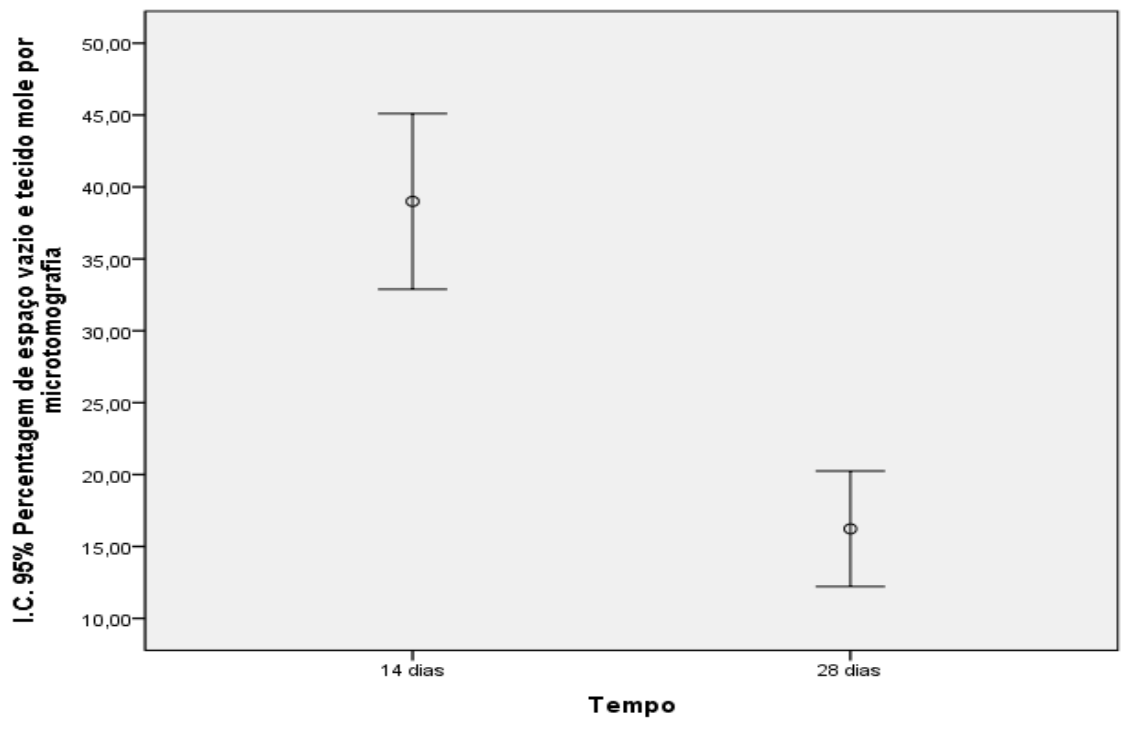
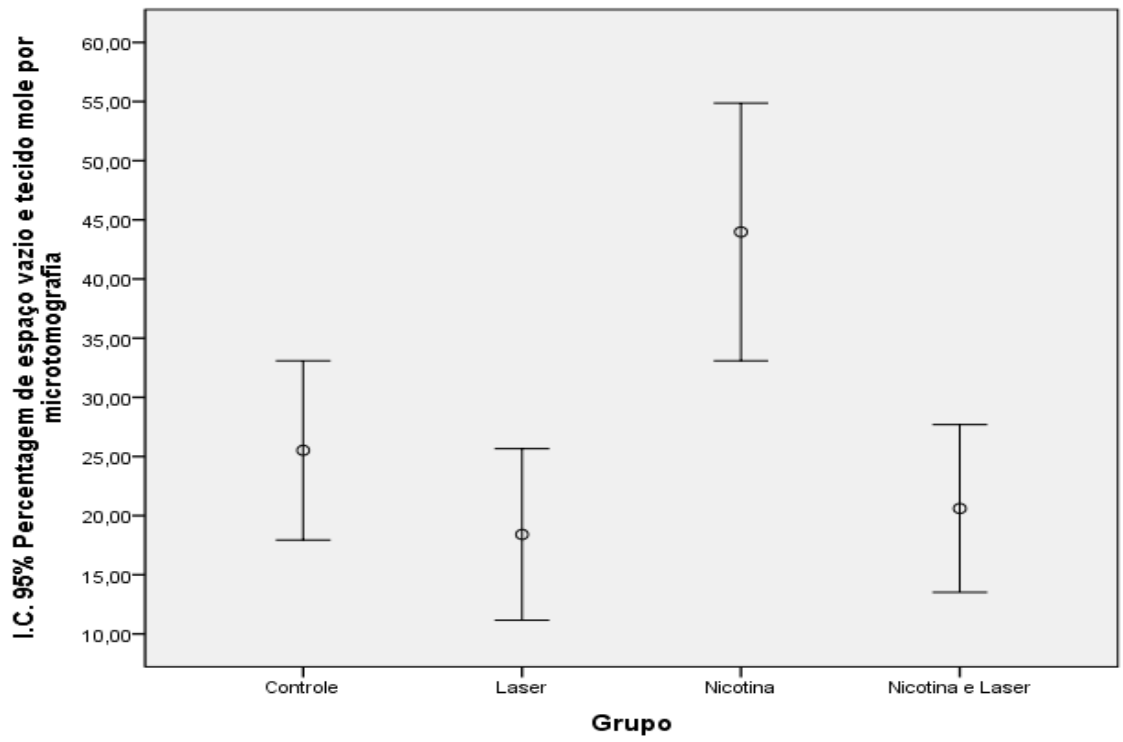
Testes de efeitos entre sujeitos

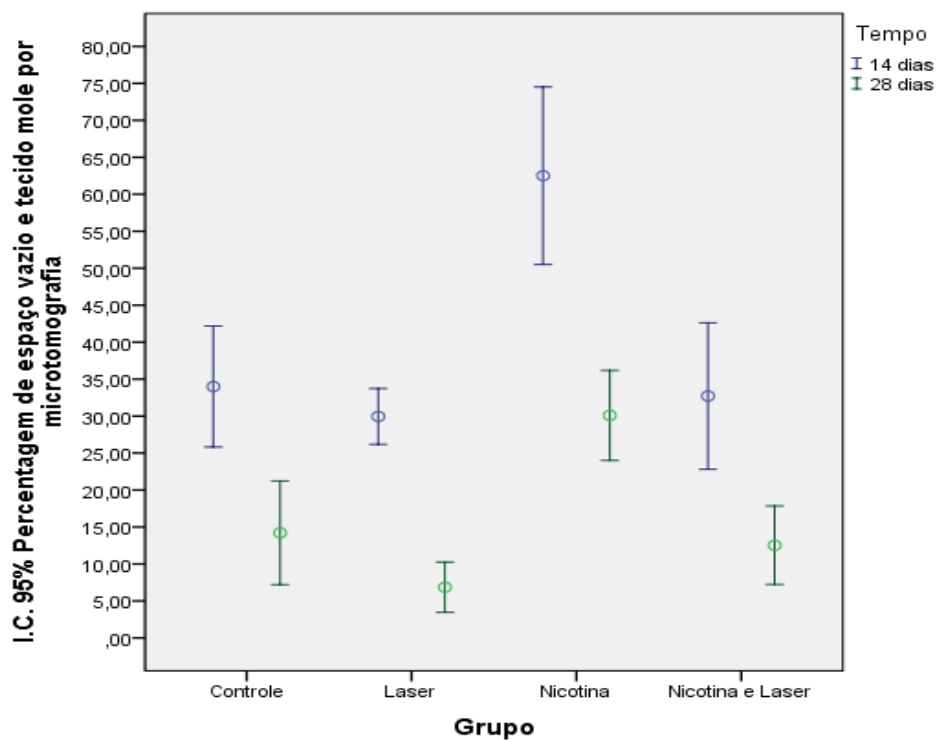
Variável dependente: Percentagem de espaço vazio e tecido mole por microtomografia

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Valor p	Poder observado ^a
GrupoxTempo	13992.752	7	1998.965	33.457	0.00000	1.00000
Erro	2927.583	49	59.747			
Total corrigido	16920.335	56				

a. R Quadrado = ,827 (R Quadrado Ajustado = ,802)

b. Calculado usando alfa = ,05





Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: Percentagem de osso total por microtomografia

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Valor p	Poder observado ^a
Grupo	6500.392	3	2166.797	36.266	0.00000	1.00000
Tempo	7948.334	1	7948.334	133.034	0.00000	1.00000
Grupo * Tempo	358.857	3	119.619	2.002	0.12592	0.48371
Erro	2927.583	49	59.747			
Total corrigido	16920.335	56				

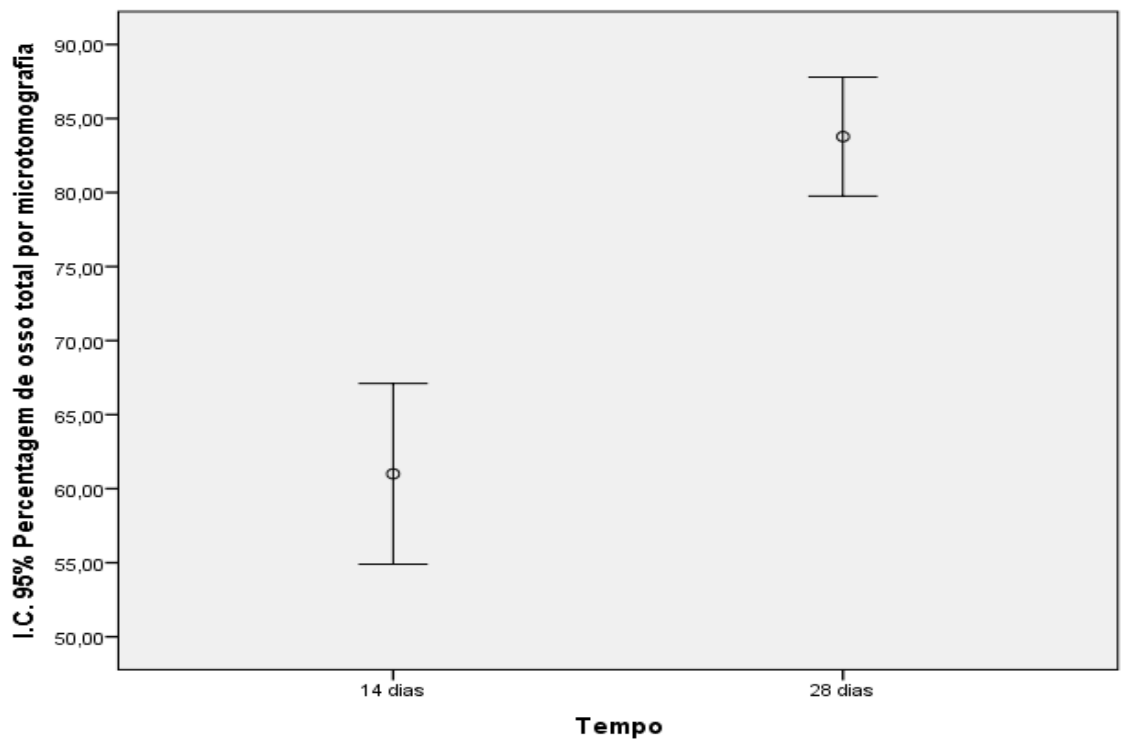
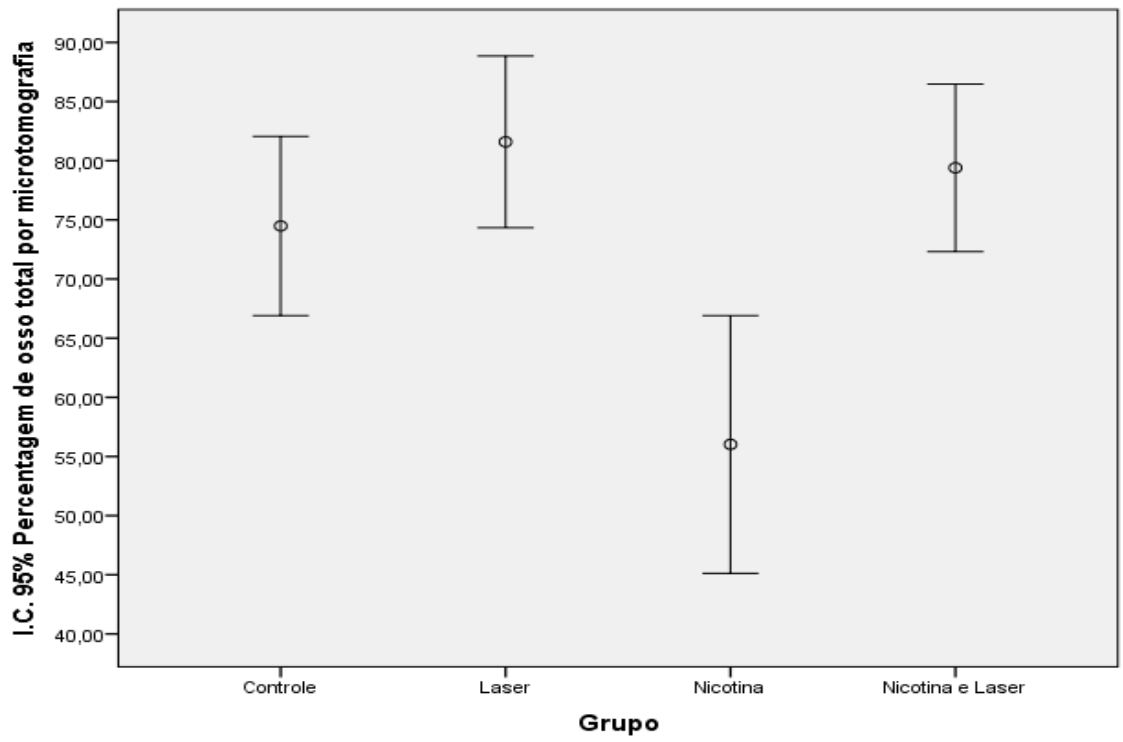
b. Calculado usando alfa = ,05

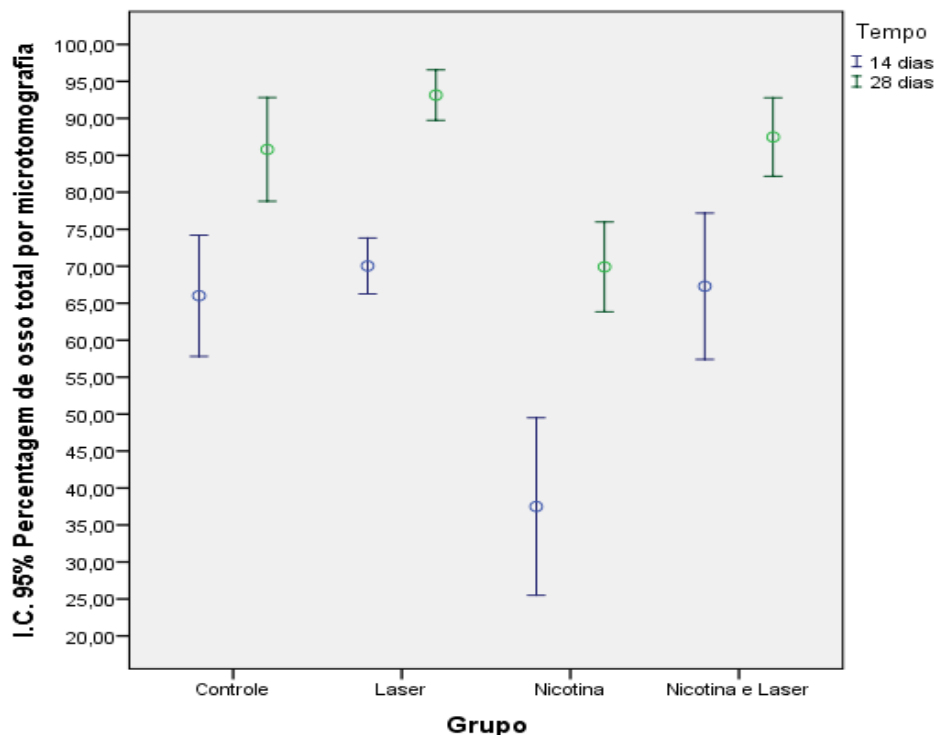
Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: Percentagem de osso total por microtomografia

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Valor p	Poder observado ^a
Grupoxtempo	13992.752	7	1998.965	33.457	0.00000	1.00000
Erro	2927.583	49	59.747			
Total corrigido	16920.335	56				

b. Calculado usando alfa = ,05





Comparações múltiplas

Tukey HSD

Variável dependente	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Valor p	Intervalo de Confiança 95%		
				Limite inferior	Limite superior	
Osso total Sirius Red	Controle - Laser	-193968,67357 [*]	56536,79250	0,00626	-343930,0279	-44007,3192
	Controle - Nicotina	-47262,95071	56536,79250	0,83710	-197224,3051	102698,4036
	Controle - Nicotina e Laser	-140767,96433	55586,52663	0,06634	-288208,7803	6672,8516
	Laser - Controle	193968,67357 [*]	56536,79250	0,00626	44007,3192	343930,0279
	Laser - Nicotina	146705,72286	56536,79250	0,05734	-3255,6315	296667,0772
	Laser - Nicotina e Laser	53200,70924	55586,52663	0,77415	-94240,1067	200641,5252
	Nicotina - Controle	47262,95071	56536,79250	0,83710	-102698,4036	197224,3051
	Nicotina - Laser	-146705,72286	56536,79250	0,05734	-296667,0772	3255,6315
	Nicotina - Nicotina e Laser	-93505,01362	55586,52663	0,34313	-240945,8296	53935,8023
	Nicotina e Laser - Controle	140767,96433	55586,52663	0,06634	-6672,8516	288208,7803
	Nicotina e Laser - Laser	-53200,70924	55586,52663	0,77415	-200641,5252	94240,1067
	Nicotina e Laser - Nicotina	93505,01362	55586,52663	0,34313	-53935,8023	240945,8296
Percentagem de espaço vazio e tecido mole por microtomografia	Controle - Laser	7,10801	5,49569	0,57116	-7,4691	21,6851
	Controle - Nicotina	-18,46473 [*]	5,49569	0,00769	-33,0418	-3,8877
	Controle - Nicotina e Laser	4,91393	5,40332	0,79989	-9,4181	19,2460
	Laser - Controle	-7,10801	5,49569	0,57116	-21,6851	7,4691
	Laser - Nicotina	-25,57274 [*]	5,49569	0,00013	-40,1498	-10,9957
	Laser - Nicotina e Laser	-2,19408	5,40332	0,97714	-16,5261	12,1380
	Nicotina - Controle	18,46473 [*]	5,49569	0,00769	3,8877	33,0418
	Nicotina - Laser	25,57274 [*]	5,49569	0,00013	10,9957	40,1498
	Nicotina - Nicotina e Laser	23,37866 [*]	5,40332	0,00038	9,0466	37,7107
	Nicotina e Laser - Controle	-4,91393	5,40332	0,79989	-19,2460	9,4181
	Nicotina e Laser - Laser	2,19408	5,40332	0,97714	-12,1380	16,5261
	Nicotina e Laser - Nicotina	-23,37866 [*]	5,40332	0,00038	-37,7107	-9,0466
Percentagem de osso total por microtomografia	Controle - Laser	-7,10801	5,49569	0,57116	-21,6851	7,4691
	Controle - Nicotina	18,46473 [*]	5,49569	0,00769	3,8877	33,0418
	Controle - Nicotina e Laser	-4,91393	5,40332	0,79989	-19,2460	9,4181
	Laser - Controle	7,10801	5,49569	0,57116	-7,4691	21,6851
	Laser - Nicotina	25,57274 [*]	5,49569	0,00013	10,9957	40,1498
	Laser - Nicotina e Laser	2,19408	5,40332	0,97714	-12,1380	16,5261
	Nicotina - Controle	-18,46473 [*]	5,49569	0,00769	-33,0418	-3,8877
	Nicotina - Laser	-25,57274 [*]	5,49569	0,00013	-40,1498	-10,9957
	Nicotina - Nicotina e Laser	-23,37866 [*]	5,40332	0,00038	-37,7107	-9,0466
	Nicotina e Laser - Controle	4,91393	5,40332	0,79989	-9,4181	19,2460
	Nicotina e Laser - Laser	-2,19408	5,40332	0,97714	-16,5261	12,1380
	Nicotina e Laser - Nicotina	23,37866 [*]	5,40332	0,00038	9,0466	37,7107

*. A diferença média é significativa no nível 0,05.

Comparações múltiplas

Variável dependente: Percentagem de osso Sirius Red
Games-Howell

(I) Grupo		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Valor p	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
Controle	Laser	-17,52690	3.10347	0.00010	-26.2453	-8.8085
	Nicotina	4.56374	4.05989	0.67830	-6.5772	15.7047
	Nicotina e Laser	-8.56388	4.03241	0.17122	-19.5990	2.4713
Laser	Controle	17,52690	3.10347	0.00010	8.8085	26.2453
	Nicotina	22,09065	3.27819	0.00001	12.8493	31.3320
	Nicotina e Laser	8.96303	3.24408	0.05385	-1.181	18.0441
Nicotina	Controle	-4.56374	4.05989	0.67830	-15.7047	6.5772
	Laser	-22,09065	3.27819	0.00001	-31.3320	-12.8493
	Nicotina e Laser	-13,12762	4.16837	0.01956	-24.5364	-1.7188
Nicotina e Laser	Controle	8.56388	4.03241	0.17122	-2.4713	19.5990
	Laser	-8.96303	3.24408	0.05385	-18.0441	.1181
	Nicotina	13,12762	4.16837	0.01956	1.7188	24.5364

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Comparações múltiplas

Tukey HSD

Variável dependente			Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Valor p	Intervalo de Confiança 95%		
						Limite inferior	Limite superior	
Osso total Sirius Red	Controle / 14 dias	Controle / 28 dias	-169458.00958	64314.26329	0.16840	-373039.6461	34123.6269	
		Laser / 14 dias	-205031.26911	61633.31341	0.03303	-400126.5741	-9935.9641	
		Laser / 28 dias	-328155.80054	61633.31341	0.00007	-523251.1055	-133060.4956	
		Nicotina / 14 dias	-2836.63125	64314.26329	1.00000	-206418.2678	200745.0053	
		Nicotina / 28 dias	-207676.19750	59543.43765	0.02142	-396156.1685	-19196.2265	
		Nicotina e Laser / 14 dias	-73538.89292	64314.26329	0.94356	-277120.5294	130042.7436	
		Nicotina e Laser / 28 dias	-306628.78069	57865.82010	0.00007	-489798.3881	-123459.1733	
		Controle / 28 dias	Controle / 14 dias	169458.00958	64314.26329	0.16840	-34123.6269	373039.6461
		Laser / 14 dias	-35573.25952	66253.82115	0.99938	-245294.4107	174147.8917	
		Laser / 28 dias	-158697.79095	66253.82115	0.26655	-368418.9422	51023.3603	
Nicotina / 14 dias	166621.37833	68754.83951	0.25338	-51016.5457	384259.3024			
Nicotina / 28 dias	-38218.18792	64314.26329	0.99880	-241799.8244	165363.4486			
Nicotina e Laser / 14 dias	95919.11667	68754.83951	0.85511	-121718.8074	313557.0407			
Nicotina e Laser / 28 dias	-137170.77111	62764.29423	0.37802	-335846.1051	61504.5628			
Laser / 14 dias	Controle / 28 dias	Controle / 14 dias	205031.26911	61633.31341	0.03303	9935.9641	400126.5741	
		Controle / 28 dias	35573.25952	66253.82115	0.99938	-174147.8917	245294.4107	
		Laser / 28 dias	-123124.53143	63654.61238	0.53506	-324618.0960	78369.0331	
		Nicotina / 14 dias	202194.63786	66253.82115	0.06618	-7526.5134	411915.7891	
		Nicotina / 28 dias	-2644.92839	61633.31341	1.00000	-197740.2334	192450.3766	
		Nicotina e Laser / 14 dias	131492.37619	66253.82115	0.50226	-78228.7750	341213.5274	
		Nicotina e Laser / 28 dias	-101597.51159	60014.14409	0.69162	-291567.4661	88372.4429	
		Controle / 14 dias	328155.80054	61633.31341	0.00007	133060.4956	523251.1055	
		Controle / 28 dias	158697.79095	66253.82115	0.26655	-51023.3603	368418.9422	
		Laser / 14 dias	123124.53143	63654.61238	0.53506	-78369.0331	324618.0960	
Nicotina / 14 dias	325319.16929	66253.82115	0.00027	115598.0181	535040.3205			
Nicotina / 28 dias	120479.60304	61633.31341	0.52166	-74615.7019	315574.9080			
Nicotina e Laser / 14 dias	254616.90762	66253.82115	0.00780	44895.7564	464338.0588			
Nicotina e Laser / 28 dias	21527.01984	60014.14409	0.99996	-168442.9346	211496.9743			
Nicotina / 14 dias	Controle / 28 dias	Controle / 14 dias	2836.63125	64314.26329	1.00000	-200745.0053	206418.2678	
		Controle / 28 dias	-166621.37833	68754.83951	0.25338	-384259.3024	51016.5457	
		Laser / 14 dias	-202194.63786	66253.82115	0.06618	-411915.7891	7526.5134	
		Laser / 28 dias	-325319.16929	66253.82115	0.00027	-535040.3205	-115598.0181	
		Nicotina / 28 dias	-204839.56625	64314.26329	0.04760	-408421.2028	-1257.9297	
		Nicotina e Laser / 14 dias	-70702.26167	68754.83951	0.96772	-288340.1857	146935.6624	
		Nicotina e Laser / 28 dias	-303792.14944	62764.29423	0.00034	-502467.4834	-105116.8155	
		Controle / 14 dias	207676.19750	59543.43765	0.02142	19196.2265	396156.1685	
		Controle / 28 dias	38218.18792	64314.26329	0.99880	-165363.4486	241799.8244	
		Laser / 14 dias	2644.92839	61633.31341	1.00000	-192450.3766	197740.2334	
Laser / 28 dias	-120479.60304	61633.31341	0.52166	-315574.9080	74615.7019			
Nicotina / 14 dias	204839.56625	64314.26329	0.04760	1257.9297	408421.2028			
Nicotina e Laser / 14 dias	134137.30458	64314.26329	0.43815	-69444.3319	337718.9411			
Nicotina e Laser / 28 dias	-98952.58319	57865.82010	0.68085	-282122.1906	84217.0242			
Nicotina e Laser / 14 dias	Controle / 28 dias	Controle / 14 dias	73538.89292	64314.26329	0.94356	-130042.7436	277120.5294	
		Controle / 28 dias	-95919.11667	68754.83951	0.85511	-313557.0407	121718.8074	
		Laser / 14 dias	-131492.37619	66253.82115	0.50226	-341213.5274	78228.7750	
		Laser / 28 dias	-254616.90762	66253.82115	0.00780	-464338.0588	-44895.7564	
		Nicotina / 14 dias	70702.26167	68754.83951	0.96772	-146935.6624	288340.1857	
		Nicotina / 28 dias	-134137.30458	64314.26329	0.43815	-337718.9411	69444.3319	
		Nicotina e Laser / 28 dias	-233089.88778	62764.29423	0.01136	-431765.2217	-34414.5538	
		Controle / 14 dias	306628.78069	57865.82010	0.00007	123459.1733	489798.3881	
		Controle / 28 dias	137170.77111	62764.29423	0.37802	-61504.5628	335846.1051	
		Laser / 14 dias	101597.51159	60014.14409	0.69162	-88372.4429	291567.4661	
Laser / 28 dias	-21527.01984	60014.14409	0.99996	-211496.9743	168442.9346			
Nicotina / 14 dias	303792.14944	62764.29423	0.00034	105116.8155	502467.4834			
Nicotina / 28 dias	98952.58319	57865.82010	0.68085	-84217.0242	282122.1906			
Nicotina e Laser / 14 dias	233089.88778	62764.29423	0.01136	34414.5538	431765.2217			

Percentagem de espaço vazio e tecido mole por microtomografia	Controle / 14 dias	Controle / 28 dias	19,78164	4,17446	0,00047	6,5677	32,9955
		Laser / 14 dias	4,03667	4,00044	0,97088	-8,6264	16,6997
		Laser / 28 dias	27,13505	4,00044	0,00000	14,4720	39,7981
		Nicotina / 14 dias	-28,51055	4,17446	0,00000	-41,7245	-15,2966
		Nicotina / 28 dias	3,90587	3,86480	0,97063	-8,3278	16,1396
		Nicotina e Laser / 14 dias	1,28504	4,17446	0,99999	-11,9289	14,4989
		Nicotina e laser / 28 dias	21,46294	3,75591	0,00002	9,5739	33,3520
		Controle / 28 dias	Controle / 14 dias	-19,78164	4,17446	0,00047	-32,9955
	Laser / 14 dias	-15,74497	4,30035	0,01320	-29,3574	-2,1326	
	Laser / 28 dias	7,35341	4,30035	0,68090	-6,2590	20,9658	
	Nicotina / 14 dias	-48,29219	4,46268	0,00000	-62,4185	-34,1659	
	Nicotina / 28 dias	-15,87577	4,17446	0,00877	-29,0897	-2,6619	
	Nicotina e Laser / 14 dias	-18,49660	4,46268	0,00314	-32,6229	-4,3703	
	Nicotina e laser / 28 dias	1,68130	4,07385	0,99989	-11,2142	14,5768	
	Laser / 14 dias	Controle / 14 dias	-4,03667	4,00044	0,97088	-16,6997	8,6264
		Controle / 28 dias	15,74497	4,30035	0,01320	2,1326	29,3574
		Laser / 28 dias	23,09838	4,13164	0,00003	10,0200	36,1768
		Nicotina / 14 dias	-32,54722	4,30035	0,00000	-46,1596	-18,9348
		Nicotina / 28 dias	-1,3079	4,00044	1,00000	-12,7939	12,5323
		Nicotina e Laser / 14 dias	-2,75163	4,30035	0,99808	-16,3640	10,8608
Nicotina e laser / 28 dias		17,42627	3,89535	0,00111	5,0959	29,7567	
Laser / 28 dias		Controle / 14 dias	-27,13505	4,00044	0,00000	-39,7981	-14,4720
	Controle / 28 dias	-7,35341	4,30035	0,68090	-20,9658	6,2590	
	Laser / 14 dias	-23,09838	4,13164	0,00003	-36,1768	-10,0200	
	Nicotina / 14 dias	-55,64560	4,30035	0,00000	-69,2580	-42,0332	
	Nicotina / 28 dias	-23,22917	4,00044	0,00001	-35,8923	-10,5661	
	Nicotina e Laser / 14 dias	-25,85001	4,30035	0,00001	-39,4624	-12,2376	
	Nicotina e laser / 28 dias	-5,67211	3,89535	0,82616	-18,0025	6,6583	
	Nicotina / 14 dias	Controle / 14 dias	28,51055	4,17446	0,00000	15,2966	41,7245
Controle / 28 dias		48,29219	4,46268	0,00000	34,1659	62,4185	
Laser / 14 dias		-32,54722	4,30035	0,00000	18,9348	46,1596	
Laser / 28 dias		55,64560	4,30035	0,00000	42,0332	69,2580	
Nicotina / 28 dias		32,41642	4,17446	0,00000	19,2025	45,6303	
Nicotina e Laser / 14 dias		29,79559	4,46268	0,00000	15,6693	43,9218	
Nicotina e laser / 28 dias		49,97349	4,07385	0,00000	37,0780	62,8689	
Nicotina / 28 dias		Controle / 14 dias	-3,90587	3,86480	0,97063	-16,1396	8,3278
	Controle / 28 dias	15,87577	4,17446	0,00877	2,6619	29,0897	
	Laser / 14 dias	1,3079	4,00044	1,00000	-12,5323	12,7939	
	Laser / 28 dias	23,22917	4,00044	0,00001	10,5661	35,8923	
	Nicotina / 14 dias	-32,41642	4,17446	0,00000	-45,6303	-19,2025	
	Nicotina e Laser / 14 dias	-2,62084	4,17446	0,99830	-15,8347	10,5931	
	Nicotina e laser / 28 dias	17,55707	3,75591	0,00058	5,6680	29,4461	
	Nicotina e Laser / 14 dias	Controle / 14 dias	-1,28504	4,17446	0,99999	-14,4989	11,9289
Controle / 28 dias		18,49660	4,46268	0,00314	4,3703	32,6229	
Laser / 14 dias		2,75163	4,30035	0,99808	-10,8608	16,3640	
Laser / 28 dias		25,85001	4,30035	0,00001	12,2376	39,4624	
Nicotina / 14 dias		-29,79559	4,46268	0,00000	-43,9218	-15,6693	
Nicotina / 28 dias		2,62084	4,17446	0,99830	-10,5931	15,8347	
Nicotina e Laser / 28 dias		20,17790	4,07385	0,00023	7,2824	33,0734	
Nicotina e laser / 28 dias		Controle / 14 dias	-21,46294	3,75591	0,00002	-33,3520	-9,5739
	Controle / 28 dias	-1,68130	4,07385	0,99989	-14,5768	11,2142	
	Laser / 14 dias	-17,42627	3,89535	0,00111	-29,7567	-5,0959	
	Laser / 28 dias	5,67211	3,89535	0,82616	-6,6583	18,0025	
	Nicotina / 14 dias	-49,97349	4,07385	0,00000	-62,8689	-37,0780	
	Nicotina / 28 dias	-17,55707	3,75591	0,00058	-29,4461	-5,6680	
	Nicotina e Laser / 14 dias	-20,17790	4,07385	0,00023	-33,0734	-7,2824	
	Percentagem de peso total por	Controle / 14 dias	Controle / 28 dias	4,17446	4,17446	0,00047	32,9955

dias			-20,11790	4,07385	0,00023	-33,3520	-1,2024
Percentagem de osso total por microtomografia	Controle / 14 dias	Controle / 28 dias	-19,78164	4,17446	0,00047	-32,9955	-6,5677
		Laser / 14 dias	-4,03667	4,00044	0,97088	-16,6997	8,6264
	Laser / 28 dias	Controle / 14 dias	-27,13505	4,00044	0,00000	-39,7981	-14,4720
		Nicotina / 14 dias	28,51055	4,17446	0,00000	15,2966	41,7245
	Nicotina / 28 dias	Controle / 14 dias	-3,90587	3,86480	0,97063	-16,1396	8,3278
		Nicotina e Laser / 14 dias	-1,28504	4,17446	0,99999	-14,4989	11,9289
	Nicotina e laser / 28 dias	Controle / 14 dias	-21,46294	3,75591	0,00002	-33,3520	-9,5739
		Nicotina e laser / 28 dias					
	Controle / 28 dias	Controle / 14 dias	19,78164	4,17446	0,00047	6,5677	32,9955
		Laser / 14 dias	15,74497	4,30035	0,01320	2,1326	29,3574
	Laser / 28 dias	Controle / 14 dias	-7,35341	4,30035	0,68090	-20,9658	6,2590
		Nicotina / 14 dias	48,29219	4,46268	0,00000	34,1659	62,4185
	Nicotina / 28 dias	Controle / 14 dias	15,87577	4,17446	0,00877	2,6619	29,0897
		Nicotina e Laser / 14 dias	18,49660	4,46268	0,00314	4,3703	32,6229
	Nicotina e laser / 28 dias	Controle / 14 dias	-1,68130	4,07385	0,99989	-14,5768	11,2142
		Nicotina e laser / 28 dias					
Laser / 14 dias	Controle / 14 dias	4,03667	4,00044	0,97088	-8,6264	16,6997	
	Controle / 28 dias	-15,74497	4,30035	0,01320	-29,3574	-2,1326	
Laser / 28 dias	Controle / 14 dias	-23,09838	4,13164	0,00003	-36,1768	-10,0200	
	Nicotina / 14 dias	32,54722	4,30035	0,00000	18,9348	46,1596	
Nicotina / 28 dias	Controle / 14 dias	.13079	4,00044	1,00000	-12,5323	12,7939	
	Nicotina e Laser / 14 dias	2,75163	4,30035	0,99808	-10,8608	16,3640	
Nicotina e laser / 28 dias	Controle / 14 dias	-17,42627	3,89535	0,00111	-29,7567	-5,0959	
	Nicotina e laser / 28 dias						
Laser / 28 dias	Controle / 14 dias	27,13505	4,00044	0,00000	14,4720	39,7981	
	Controle / 28 dias	7,35341	4,30035	0,68090	-6,2590	20,9658	
Laser / 14 dias	Controle / 14 dias	23,09838	4,13164	0,00003	10,0200	36,1768	
	Nicotina / 14 dias	55,64560	4,30035	0,00000	42,0332	69,2580	
Nicotina / 28 dias	Controle / 14 dias	23,22917	4,00044	0,00001	10,5661	35,8923	
	Nicotina e Laser / 14 dias	25,85001	4,30035	0,00001	12,2376	39,4624	
Nicotina e laser / 28 dias	Controle / 14 dias	5,67211	3,89535	0,82616	-6,6583	18,0025	
	Nicotina e laser / 28 dias						
Nicotina / 14 dias	Controle / 14 dias	-28,51055	4,17446	0,00000	-41,7245	-15,2966	
	Controle / 28 dias	-48,29219	4,46268	0,00000	-62,4185	-34,1659	
Laser / 14 dias	Controle / 14 dias	-32,54722	4,30035	0,00000	-46,1596	-18,9348	
	Laser / 28 dias	-55,64560	4,30035	0,00000	-69,2580	-42,0332	
Nicotina / 28 dias	Controle / 14 dias	-32,41642	4,17446	0,00000	-45,6303	-19,2025	
	Nicotina e Laser / 14 dias	-29,79559	4,46268	0,00000	-43,9218	-15,6693	
Nicotina e laser / 28 dias	Controle / 14 dias	-49,97349	4,07385	0,00000	-62,8689	-37,0780	
	Nicotina e laser / 28 dias						
Nicotina / 28 dias	Controle / 14 dias	3,90587	3,86480	0,97063	-8,3278	16,1396	
	Controle / 28 dias	-15,87577	4,17446	0,00877	-29,0897	-2,6619	
Laser / 14 dias	Controle / 14 dias	-1,13079	4,00044	1,00000	-12,7939	12,5323	
	Laser / 28 dias	-23,22917	4,00044	0,00001	-35,8923	-10,5661	
Nicotina / 14 dias	Controle / 14 dias	32,41642	4,17446	0,00000	19,2025	45,6303	
	Nicotina e Laser / 14 dias	2,62084	4,17446	0,99830	-10,5931	15,8347	
Nicotina e laser / 28 dias	Controle / 14 dias	-17,55707	3,75591	0,00058	-29,4461	-5,6680	
	Nicotina e laser / 28 dias						
Nicotina e Laser / 14 dias	Controle / 14 dias	1,28504	4,17446	0,99999	-11,9289	14,4989	
	Controle / 28 dias	-18,49660	4,46268	0,00314	-32,6229	-4,3703	
Laser / 14 dias	Laser / 14 dias	-2,75163	4,30035	0,99808	-16,3640	10,8608	
	Laser / 28 dias	-25,85001	4,30035	0,00001	-39,4624	-12,2376	
Nicotina / 14 dias	Nicotina / 14 dias	29,79559	4,46268	0,00000	15,6693	43,9218	
	Nicotina / 28 dias	-2,62084	4,17446	0,99830	-15,8347	10,5931	
Nicotina e laser / 28 dias	Controle / 14 dias	-20,17790	4,07385	0,00023	-33,0734	-7,2824	
	Nicotina e laser / 28 dias						
Nicotina e laser / 28 dias	Controle / 14 dias	21,46294	3,75591	0,00002	9,5739	33,3520	
	Controle / 28 dias	1,68130	4,07385	0,99989	-11,2142	14,5768	
Laser / 14 dias	Laser / 14 dias	17,42627	3,89535	0,00111	5,0959	29,7567	
	Laser / 28 dias	-5,67211	3,89535	0,82616	-18,0025	6,6583	
Nicotina / 14 dias	Nicotina / 14 dias	49,97349	4,07385	0,00000	37,0780	62,8689	
	Nicotina / 28 dias	17,55707	3,75591	0,00058	5,6680	29,4461	
Nicotina e Laser / 14 dias	Nicotina e Laser / 14 dias	20,17790	4,07385	0,00023	7,2824	33,0734	
	Nicotina e Laser / 14 dias						

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Comparações múltiplas

Variável dependente: Percentagem de osso Sirius Red
Games-Howell

(I) Grupo x Tempo	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Valor p	Intervalo de Confiança 95%		
				Limite inferior	Limite superior	
Controle / 14 dias	Controle / 28 dias	-14,37528	4,71119	0,20178	-35,5471	6,7966
	Laser / 14 dias	-19,96399	1,74258	0,00000	-26,4133	-13,5147
	Laser / 28 dias	-27,41148	1,62313	0,00000	-33,3415	-21,4815
	Nicotina / 14 dias	9,69929	1,72617	0,00457	3,1025	16,2961
	Nicotina / 28 dias	-10,06938	2,12054	0,01076	-17,9569	-2,1818
	Nicotina e Laser / 14 dias	-2,83666	2,89957	0,96276	-15,2113	9,5380
	Nicotina e laser / 28 dias	-22,65008	1,78767	0,00000	-29,0068	-16,2934
Controle / 28 dias	Controle / 14 dias	14,37528	4,71119	0,20178	-6,7966	35,5471
	Laser / 14 dias	-5,58872	4,83513	0,91958	-26,5302	15,3528
	Laser / 28 dias	-13,03620	4,79337	0,27341	-34,0415	7,9691
	Nicotina / 14 dias	24,07457	4,82923	0,02689	3,1132	45,0360
	Nicotina / 28 dias	4,30590	4,98383	0,98062	-16,4876	25,0994
	Nicotina e Laser / 14 dias	11,53862	5,36184	0,45669	-9,5878	32,6651
	Nicotina e laser / 28 dias	-8,27480	4,85156	0,68818	-29,1774	12,6277
Laser / 14 dias	Controle / 14 dias	19,96399	1,74258	0,00000	13,5147	26,4133
	Controle / 28 dias	5,58872	4,83513	0,91958	-15,3528	26,5302
	Laser / 28 dias	-7,44749	1,95389	0,03698	-14,5334	-3,615
	Nicotina / 14 dias	29,66328	2,04029	0,00000	22,1494	37,1772
	Nicotina / 28 dias	9,89462	2,38324	0,01934	1,3401	18,4491
	Nicotina e Laser / 14 dias	17,12734	3,09688	0,00839	4,7470	29,5076
	Nicotina e laser / 28 dias	-2,68609	2,09258	0,89055	-10,0831	4,7110
Laser / 28 dias	Controle / 14 dias	27,41148	1,62313	0,00000	21,4815	33,3415
	Controle / 28 dias	13,03620	4,79337	0,27341	-7,9691	34,0415
	Laser / 14 dias	7,44749	1,95389	0,03698	,3615	14,5334
	Nicotina / 14 dias	37,11077	1,93926	0,00000	29,9305	44,2911
	Nicotina / 28 dias	17,34210	2,29734	0,00013	9,0362	25,6480
	Nicotina e Laser / 14 dias	24,57483	3,03127	0,00096	12,2313	36,9184
	Nicotina e laser / 28 dias	4,76140	1,99420	0,31680	-2,2755	11,7983
Nicotina / 14 dias	Controle / 14 dias	-9,69929	1,72617	0,00457	-16,2961	-3,1025
	Controle / 28 dias	-24,07457	4,82923	0,02689	-45,0360	-3,1132
	Laser / 14 dias	-29,66328	2,04029	0,00000	-37,1772	-22,1494
	Laser / 28 dias	-37,11077	1,93926	0,00000	-44,2911	-29,9305
	Nicotina / 28 dias	-19,76867	2,37126	0,00005	-28,3680	-11,1693
	Nicotina e Laser / 14 dias	-12,53595	3,08767	0,04767	-24,9504	-,1215
	Nicotina e laser / 28 dias	-32,34937	2,07893	0,00000	-39,8139	-24,8849
Nicotina / 28 dias	Controle / 14 dias	10,06938	2,12054	0,01076	2,1818	17,9569
	Controle / 28 dias	-4,30590	4,98383	0,98062	-25,0994	16,4876
	Laser / 14 dias	-9,89462	2,38324	0,01934	-18,4491	-1,3401
	Laser / 28 dias	-17,34210	2,29734	0,00013	-25,6480	-9,0362
	Nicotina / 14 dias	19,76867	2,37126	0,00005	11,1693	28,3680
	Nicotina e Laser / 14 dias	7,23272	3,32427	0,43751	-5,4118	19,8772
	Nicotina e laser / 28 dias	-12,58070	2,41640	0,00257	-21,1228	-4,0386
Nicotina e Laser / 14 dias	Controle / 14 dias	2,83666	2,89957	0,96276	-9,5380	15,2113
	Controle / 28 dias	-11,53862	5,36184	0,45669	-32,6651	9,5878
	Laser / 14 dias	-17,12734	3,09688	0,00839	-29,5076	-4,7470
	Laser / 28 dias	-24,57483	3,03127	0,00096	-36,9184	-12,2313
	Nicotina / 14 dias	12,53595	3,08767	0,04767	,1215	24,9504
	Nicotina / 28 dias	-7,23272	3,32427	0,43751	-19,8772	5,4118
	Nicotina e laser / 28 dias	-19,81343	3,12247	0,00310	-32,1564	-7,4705
Nicotina e laser / 28 dias	Controle / 14 dias	22,65008	1,78767	0,00000	16,2934	29,0068
	Controle / 28 dias	8,27480	4,85156	0,68818	-12,6277	29,1774
	Laser / 14 dias	2,68609	2,09258	0,89055	-4,7110	10,0831
	Laser / 28 dias	-4,76140	1,99420	0,31680	-11,7983	2,2755
	Nicotina / 14 dias	32,34937	2,07893	0,00000	24,8849	39,8139
	Nicotina / 28 dias	12,58070	2,41640	0,00257	4,0386	21,1228
	Nicotina e Laser / 14 dias	19,81343	3,12247	0,00310	7,4705	32,1564

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Correlações

		Osso total Sirius Red	Alvéolo total Sirius Red	Percentagem de osso Sirius Red	Percentagem de colágeno Tipo I	Percentagem de espaço vazio e tecido mole por microtomografia	Percentagem de osso total por microtomografia
Osso total Sirius Red	Correlação de Pearson	1	,520 ^{**}	,760 ^{**}	-,310 ^{**}	-,534 ^{**}	,534 ^{**}
	Valor p		,000	,000	,019	,000	,000
	N	57	57	57	57	57	57
Alvéolo total Sirius Red	Correlação de Pearson	,520 ^{**}	1	-,121	-,079	,207	-,207
	Valor p	,000		,370	,559	,122	,122
	N	57	57	57	57	57	57
Percentagem de osso Sirius Red	Correlação de Pearson	,760 ^{**}	-,121	1	-,306 ^{**}	-,751 ^{**}	,751 ^{**}
	Valor p	,000	,370		,021	,000	,000
	N	57	57	57	57	57	57
Percentagem de colágeno Tipo I	Correlação de Pearson	-,310 ^{**}	-,079	-,306 ^{**}	1	,260	-,260
	Valor p	,019	,559	,021		,051	,051
	N	57	57	57	57	57	57
Percentagem de espaço vazio e tecido mole por microtomografia	Correlação de Pearson	-,534 ^{**}	,207	-,751 ^{**}	,260	1	-,1000 ^{**}
	Valor p	,000	,122	,000	,051		0,000
	N	57	57	57	57	57	57
Percentagem de osso total por microtomografia	Correlação de Pearson	,534 ^{**}	-,207	,751 ^{**}	-,260	-,1000 ^{**}	1
	Valor p	,000	,122	,000	,051	0,000	
	N	57	57	57	57	57	57

** A correlação é significativa no nível 0,01 (bilateral).

* A correlação é significativa no nível 0,05 (bilateral).

O coeficiente de correlação de pearson mede o grau de associação entre as duas variáveis:

0,00 |----- 0,30 - Fraca

0,30 |----- 0,60 - Regular

0,60 |----- 0,90 - Forte

0,90 |----- 1,00 - Muito Forte

Bioestatística: Princípios e aplicações - Sídia Callegari-Jacques. Artmed. 2003. 256 p.

Normas para a publicação do artigo:

International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery

Guide for Authors

Would authors please note that the reference style for the journal has now changed. Please pay special attention to the guidelines under the heading "References" below

Authors wishing to submit their work to the journal are urged to read this detailed guide for authors and comply with all the requirements, particularly those relating to manuscript length and format. This will speed up the reviewing process and reduce the time taken to publish a paper following acceptance.

Online Submission

Submission and peer-review of all papers is now conducted entirely online, increasing efficiency for editors, authors, and reviewers, and enhancing publication speed. Authors requiring further information on online submission are strongly encouraged to view the system, including a tutorial, at <http://ees.elsevier.com/ijoms> (<http://ees.elsevier.com/ijoms>) A comprehensive Author Support service is available to answer additional enquiries at

✉ authorsupport@elsevier.com (mailto:authorsupport@elsevier.com) .Once a paper has been submitted, all subsequent correspondence between the Editorial Office (✉ ijoms@elsevier.com (mailto:ijoms@elsevier.com)) and the corresponding author will be by e-mail.

Editorial Policy

A paper is accepted for publication on the understanding that it has not been submitted simultaneously to another journal, has been read and approved by all authors, and that the work has not been published before. The Editors reserve the right to make editorial and literary corrections. Any opinions expressed or policies advocated do not necessarily reflect the opinions and policies of the Editors.

Declarations

Upon submission you will be required to complete and upload the declarations page (↓ pdf version(http://cdn.elsevier.com/promis_misc/YIJOM_Declarations.pdf) or ↓wordversion (http://cdn.elsevier.com/promis_misc/YIJOM_Declarations.doc)) to declare funding, conflict of interest and to indicate that ethical approval was given – all studies involving patients must have patient consent and ethical committee approval, please refer to the section on ‘Ethics’ below. This information must also be inserted into your manuscript under the acknowledgements section with the headings below. Upon submission you will be required to complete and upload this form (pdf version or word version) to declare funding, conflict of interest, and to indicate whether ethical approval and patient consent were given. Lastly you must confirm that all authors have agreed to the submission.

PLEASE NOTE that all funding must be declared at first submission, as the addition of funding at acceptance stage may invalidate the acceptance of your manuscript.

Authorship

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

Normally one or two, and no more than three, authors should appear on a short communication, technical note or interesting case/lesson learnt. Full length articles may contain as many authors as appropriate. Minor contributors and non-contributory clinicians who have allowed their patients to be used in the paper should be acknowledged at the end of the text and before the references.

The corresponding author is responsible for ensuring that all authors are aware of their obligations.

Before a paper is accepted all the authors of the paper must sign the Confirmation of Authorship form. This form confirms that all the named authors agree to publication if the paper is accepted and that each has had significant input into the paper. Please download the form and send it to the Editorial Office. (↓ pdf version (http://www.elsevier.com/framework_products/promis_misc/IJOMSform.pdf) or ↓ word version (http://www.elsevier.com/framework_products/promis_misc/IJOMSform.doc)) It is advisable that to prevent delay this form is submitted early in the editorial process.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the main text, all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If an author has no conflict of interest to declare, this should be stated.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$, excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies> (<http://www.elsevier.com/fundingbodies>). Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at ↓ <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf> (<http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>)). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights> (<http://www.elsevier.com/authorsrights>).

Ethics

Any manuscript concerned with human subjects, medical records, or human tissue that is submitted to the International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery should comply with the principles stated in the Declaration of Helsinki “Ethical Principles for Medical Research Involving ‘Human Subjects’”, adopted by the th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June , and as amended most recently by the th World Medical Assembly, Fontaleza, Brazil, October .

The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate Ethical Committee related to the institution(s) in which the work was performed, and that subjects gave informed consent to the work. The International Journal of Oral and


Maxillofacial Surgery requires institutional Ethics Committee approval for all human studies. For retrospective studies of records either a statement of approval or a statement of exemption from the Committee is appropriate. This statement should be provided upon submission of the manuscript.

Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines.

Patient confidentiality

Patients have a right to privacy. Therefore identifying information, including patients' images, names, initials, or hospital numbers, should not be included in videos, recordings, written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and you have obtained written informed consent for publication in print and electronic form from the patient (or parent, guardian or next of kin where applicable). If such consent is made subject to any conditions, The Editor and Publisher must be made aware of all such conditions. Written consents must be provided to the Editorial Office on request. Even where consent has been given, identifying details should be omitted if they are not essential. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note. If consent for publication has not been obtained, personal details of patients included in any part of the paper and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Language Editing Services

Papers will only be accepted when they are written in an acceptable standard of English. Authors, particularly those whose first language is not English, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission should visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> (<http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing>) or contact  authorsupport@elsevier.com (<mailto:authorsupport@elsevier.com>) for more information. Please note, Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more

information please refer to our Terms and Conditions

http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

(http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions).

Article Types

The following contributions will be accepted for publication. Please take careful note of the maximum length where applicable. Overlength articles will be returned to the authors without peer review: • editorials (commissioned by the editor)

• clinical papers: no more than words and references • research papers: no more than words and references • review papers - no limit on length or number of references • technical notes (surgical techniques, new instruments, technical innovations) - no more than words, references and figures • case reports - no more than words, references and figures • book reviews • letters to the editor - please see detailed guidelines provided at the end of the main guide

for authors • IAOMS announcements • general announcements.

Please note: Case reports will be considered for publication only if they add new information to the existing body of knowledge or present new points of view on known diseases.

All authors must have contributed to the paper, not necessarily the patient treatment. Technical notes and case reports are limited to a maximum of authors, in exceptional circumstances, .

Criteria for Publication

Papers that will be considered for publication should be: • focused • based on a sound hypothesis and an adequate investigation method analysing a statistically relevant series, leading to relevant results that back the conclusion • well written in simple, scientific English grammar and style • presented with a clear message and containing new information that is relevant for the readership of the journal • Note the comment above relating to case reports.

Following peer-review, authors are required to resubmit their revised paper within months; in

exceptional circumstances, this timeline may be extended at the editor's discretion.

Presentation of Manuscripts

General points

Papers should be submitted in journal style. Failure to do so will result in the paper being immediately returned to the author and may lead to significant delays in publication. Spelling may follow British or American usage, but not a mixture of the two. Papers should be double-spaced with a margin of at least cm all round. Each line must be numbered.

Format

Observational or Case Cohort Studies, as well as Case Series must be presented in conformance with STROBE guidelines: www.strobe-statement.org (www.strobe-statement.org)

Randomized Controlled Trials must be presented in conformance with CONSORT guidelines: www.consort-statement.org (www.consort-statement.org)

Systematic Reviews and Meta-Analyses must be presented according to PRISMA guidelines: www.prisma-statement.org (www.prisma-statement.org)

Papers should be set out as follows, with each section beginning on a separate page: • title page • abstract • text

• acknowledgements • references • tables • captions to illustrations. Please note that the qualifications of the authors will not be included in the published paper and should not be listed anywhere on the manuscript.

Title page

The title page should give the following information: • title of the article • full name of each author • name and address of the department or institution to which the work should be attributed • name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author responsible for correspondence and to whom requests for offprints should be sent •

sources of support in the form of grants • key words. If the title is longer than characters (including spaces), a short title should be supplied for use in the running heads.

Abstract

words maximum. Do not use subheadings or abbreviations; write as a continuous paragraph. Must contain all relevant information, including results and conclusion.

Text

Please ensure that the text of your paper conforms to the following structure: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion. There is no separate Conclusion section. There should be no mention of the institution where the work was carried out, especially in the Materials and Methods section.

Introduction

- Present first the nature and scope of the problem investigated • Review briefly the pertinent literature • State the rationale for the study • Explain the purpose in writing the paper
- State the method of investigation and the reasons for the choice of a particular method •; Should be written in the present tense

Materials and Methods

- Give the full details, limit references • Should be written in the past tense • Include exact technical specifications, quantities and generic names • Limit the number of subheadings, and use the same in the results section • Mention statistical method • Do not include results in this section

Results

- Do not describe methods • Present results in the past tense • Present representations rather than endlessly repetitive data • Use tables where appropriate, and do not repeat information in the text

Discussion

- Discuss - do not recapitulate results
- Point out exceptions and lack of correlations. Do not try to cover up or 'fudge' data
- Show how results agree/contrast with previous work
- Discuss the implications of your findings
- State your conclusions very clearly

Headings: Headings enhance readability but should be appropriate to the nature of the paper. They should be kept to a minimum and may be removed by the Editors. Normally only two categories of headings should be used: major ones should be typed in capital letters; minor ones should be typed in lower case (with an initial capital letter) at the left hand margin.

Quantitative analysis: If any statistical methods are used, the text should state the test or other analytical method applied, basic descriptive statistics, critical value obtained, degrees of freedom, and significance level, e.g. (ANOVA, $F = . ; df = , ; P < .$). If a computer data analysis was involved, the software package should be mentioned. Descriptive statistics may be presented in the form of a table, or included in the text.

Abbreviations, symbols, and nomenclature: Only standardized terms, which have been generally accepted, should be used. Unfamiliar abbreviations must be defined when first used. For further details concerning abbreviations, see Baron DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors, London, Royal Society of Medicine, (available from The Royal Society of Medicine Services, Wimpole Street, London W M AE, UK).

The minus sign should be -. If a special designation for teeth is used, a note should explain the symbols. Scientific names of organisms should be binomials, the generic name only with a capital, and should be italicised in the typescript. Microorganisms should be named according to the latest edition of the Manual of Clinical Microbiology, American Society of Microbiology.

Drugs: use only generic (non-proprietary) names in the text. Suppliers of drugs used may be named in the Acknowledgments section. Do not use 'he', 'his' etc where the sex of the person is unknown; say 'the patient' etc. Avoid inelegant alternatives such as 'he/she'. Patients should not be automatically designated as 'she', and doctors as 'he'.

References

The journal's reference style has changed. References should be numbered consecutively throughout the article, beginning with for the first-cited reference. References should be listed at the end of the paper in the order in which they appear in the text (not listed alphabetically by author and numbered as previously).

The accuracy of references is the responsibility of the author. References in the text should be numbered with superscript numerals inside punctuation: for example "Kenneth and Cohen¹⁴ showed..."; "each technique has advantages and disadvantages⁵⁻¹³." Citations in the text to papers with more than two authors should give the name of the first author followed by "et al."; for example: "Wang et al³⁷ identified..."

All references cited in the text must be included in the list of references at the end of the paper. Each reference listed must include the names of all authors. Please see section "Article Types" for guidance on the maximum number of reference for each type of article.

Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus (see www.nlm.nih.gov) (<http://www.nlm.nih.gov>) . When citing papers from monographs and books, give the author, title of chapter, editor of book, title of book, publisher, place and year of publication, first and last page numbers. Internet pages and online resources may be included within the text and should state as a minimum the author(s), title and full URL. The date of access should be supplied and all URLs should be checked again at proof stage.

Examples: Journal article: Halsband ER, Hirshberg YA, Berg LI. Ketamine hydrochloride in outpatient oral surgery. *J Oral Surg* : : - . When citing a paper which has a Digital Object Identifier (DOI), use the following style: Toschka H, Feifel H. Aesthetic and functional results of harvesting radial forearm flap. *Int J Oral Maxillofac Surg* : : - . doi: . /ijom. .

Book/monograph: Costich ER, White RP. Fundamentals of oral surgery. Philadelphia: WB Saunders, : - . Book chapter: Hodge HC, Smith FA. Biological properties of inorganic fluorides. In: Simons JH, ed.: Fluorine chemistry. New York: Academic Press, : . Internet resource: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. <http://www.icmje.org>

(<http://www.icmje.org>) [Accessibility verified March ,]

Tables

Tables should be used only to clarify important points. Double documentation in the form of tables and figures is not acceptable. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. They should be double spaced on separate pages and contain only horizontal rules. Do not submit tables as photographs. A short descriptive title should appear above each table, with any footnotes suitably identified below. Care must be taken to ensure that all units are included. Ensure that each table is cited in the text.

Figures

All illustrations (e.g. graphs, drawings or photographs) are considered to be figures, and should be numbered in sequence with Arabic numerals. Each figure should have a caption, typed double-spaced on a separate page and numbered correspondingly. The minimum resolution for electronically generated figures is dpi.

Line illustrations: All line illustrations should present a crisp black image on an even white background (x mm (x in), or no larger than x mm (x in). The size of the lettering should be appropriate, taking into account the necessary size reduction.

Photographs and radiographs: Photomicrographs should show magnification and details of any staining techniques used. The area(s) of interest must be clearly indicated with arrows or other symbols.

Colour images are encouraged, but the decision whether an illustration is accepted for reproduction in colour in the printed journal lies with the editor-in-chief. Figures supplied in colour will appear in colour in the online version of the journal.

Size of photographs: The final size of photographs will be: (a) single column width (mm), (b) double column width (mm), (c) full page width (mm). Photographs should ideally be submitted at the final reproduction size based on the above figures.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies> (<http://www.elsevier.com/fundingbodies>)

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, which they are requested to correct and return within hours. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep.html>

(<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep.html>) . Instructions on how to annotate

PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#win>

(<http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#win>) .If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author will be provided, at no cost, with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author. Elsevier supports responsible sharing. Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Accepted Articles

For the facility to track accepted articles and set email alerts to inform you of when an article's status has changed, visit: <http://authors.elsevier.com/TrackPaper.html>

(<http://authors.elsevier.com/TrackPaper.html>) There are also detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those related to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Instructions for Letters to the Editor

The IJOMS welcomes Letters to the Editor. To facilitate submission of the highest quality of Letters to the Editor, the following guidelines should be followed: . Letters are meant to be focus pieces and, therefore, are limited to no more than words, references and a maximum of figures. One reference should include a reference to the IJOMS article being addressed.

. It is recommended that you limit your letter to one or two important and critical points to which you wish to provide a clear and precise discussion regarding the previously published article.

. One should support all assertion by peer review literature which should be a primary research or large clinical studies rather than a case report. . Please include any financial disclosures at the end of the letter. This would include the potential conflicts of interest not just related to the specific content of your letter but also the content of the IJOMS article and other related areas.

. Please recognize that letters that are essentially in agreement with the author's findings and

offer no additional insights provide little new information for publication. Likewise, letters that highlight the writer's own research or are otherwise self promotional will receive a low publication priority.

. There may be a need for additional editing. Should editing be required the letter will be sent back to the author for final approval of the edited version. . It is important to use civil and professional discourse. It is not advisable that one adopt a tone that may be misconstrued to be in anyway insulting.

. Finally, it is not advisable to provide a letter that is anecdotal. While personal experiences can have great value in patient care, it is generally not strong evidence to be placed in a letter to the editor.



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 14 de Agosto de 2014.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 0879 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Influência da laserterapia na cicatrização óssea em animais expostos a nicotina.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sônia Luczyszyn

EQUIPE DE PESQUISA: Sônia Luczyszyn, Rita Pucci

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Saúde e Biociências – Pós Graduação Odontologia

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Ratos wistar	Machos	120 dias 280 – 230g	B / Mediato	40 (10 por grupo)

O colegiado do CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de **14.08.2014**. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório á CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo. **Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a esta CEUA.**

Atenciosamente,

Profa. Dra.  Marta Luciane Fischer

Coordenadora

Comitê de Ética no Uso de Animais

Marta Luciane Fischer
Coordenadora
Comitê de Ética no Uso de Animais - PUCPR



Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br