



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



POLLYANA MATTIAS NARCISO SILVA

**EFEITO DA LASERTERAPIA EM BAIXA INTENSIDADE (LLLT)
COM LUZ INFRAVERMELHA NO REPARO ÓSSEO DE ÁREAS
ENXERTADAS COM OSSO BOVINO DESPROTEINIZADO**

UBERLÂNDIA

2021

POLLYANA MATTIAS NARCISO SILVA

**EFEITO DA LASERTERAPIA EM BAIXA INTENSIDADE (LLLT)
COM LUZ INFRAVERMELHA NO REPARO ÓSSEO DE ÁREAS
ENXERTADAS COM OSSO BOVINO DESPROTEINIZADO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
a Faculdade de Odontologia da UFU, como
requisito parcial para obtenção do título de
Graduado em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme José
Pimentel Lopes de Oliveira

Co-orientador: Victor Quiroz Flores

UBERLÂNDIA

2021

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO.....	9
OBJETIVO	12
HIPÓTESE	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
RESULTADOS	22
DISCUSSÃO.....	24
CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS	29
ANEXO: Certificado do CEUA/UFU	35

Resumo

RESUMO

O objetivo desse estudo foi de avaliar o efeito de 4 sessões da Laserterapia em baixa intensidade (LLLT) com a luz infravermelha no reparo ósseo de áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado em mandíbulas de ratos. Os 24 animais foram selecionados aleatoriamente e divididos em 2 grupos com 12 animais cada, que foram avaliados em dois períodos experimentais (30 e 90 dias), com 6 animais em cada grupo e período experimental. Os grupos foram divididos de acordo com o a aplicação ou não da LLLT nas áreas enxertadas: CTR: Área enxertada não irradiada; IRL: Área enxertada irradiada com o laser infravermelho em 4 sessões. Foram instalados bilateralmente no ramo da mandíbula de cada animal uma cápsula de teflon em forma de domo, que foi preenchida com osso bovino desproteínizado que foi posteriormente fixada na mandíbula por meio de suturas com fio de seda 4.0 que transpassaram a própria cápsula e as perfurações executadas no ramo da mandíbula e que posteriormente foram submetidos ou não ao tratamento com o LLLT. Foi executado avaliação do volume de tecido mineralizado na área enxertada por meio de análise microtomográfica. Foi verificado um maior volume de tecidos mineralizados em áreas tratadas com LLLT em relação as áreas enxertadas que não foram irradiadas. Pode-se concluir que a aplicação da LLLT com luz infra-vermelha em 4 sessões promoveu maior volume de tecidos mineraziados em áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado.

Palavras-chaves: Enxerto ósseo, laser, osso

Abstract

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of 4 sessions of low intensity laser therapy (LLLT) with infrared light on the bone repair of areas grafted with deproteinized bovine bone in rat mandibles. The 24 animals were randomly selected and divided into 2 groups with 12 animals each, which were evaluated in two experimental periods (30 and 90 days), with 6 animals in each group and experimental period. The groups were divided according to the application or not of the LLLT in the grafted areas: CTR: Non-irradiated grafted area; IRL: Grafted area irradiated with infrared laser in 4 sessions. A dome-shaped teflon capsule was bilaterally installed in the mandible branch of each animal, which was filled with deproteinized bovine bone. The dome-shaped teflon capsule was fixed to the mandible by means of sutures with 4.0 silk thread that passed through the capsule itself and the perforations performed in the bone tissue. The evaluation of the volume of mineralized tissue in the grafted area was carried out by means of microtomographic analysis. A greater volume of mineralized tissues was noted in areas treated with LLLT in relation to the grafted areas that were not irradiated. It can be concluded that the application of LLLT with infrared light in 4 sessions promoted a greater volume of mineralized tissues in areas grafted with deproteinized bovine bone.

Key-word: Bone, bone graft, laser

Introdução

INTRODUÇÃO

O laser de baixa intensidade é conceituado como um laser que não causa alteração morfológica nos tecidos, sendo utilizado em uma potência e em um comprimento de onda específicos com intenção de induzir reações de diferenciação e proliferação celular, bem como aumentar a síntese de matriz de células de diferentes tipos de tecidos conjuntivos, assim como acelerar o metabolismo em células musculares, nervosas e epiteliais (Nissan et al., 2006; Kim et al., 2007; Park et al., 2012). Na odontologia, os lasers têm sido utilizados em praticamente todas suas áreas de conhecimento. Especificamente em periodontia e implantodontia os lasers tem sido aplicados para tratamento periodontal e peri-implantar não-cirúrgico através da terapia fotodinâmica (Takasaki et al., 2009), para aceleração da cicatrização de tecidos moles e duros (Lopes et al., 2005; AboElsaad et al., 2009; Cunha et al., 2009 Park et al., 2012) e aceleração da osseointegração (Dörtbudak et al., 2002; Guzzardella et al., 2003; Pereira et al., 2009; Campanha et al., 2010).

Uma revisão de literatura sobre aplicação da terapia fotodinâmica no tratamento periodontal não-cirúrgico descreveu que a terapia fotodinâmica promove melhoras adicionais nos parâmetros periodontais tanto em periodontite crônica como agressiva quanto aplicados associados a raspagem (Takasaki et al., 2009). Justifica-se esses resultados devido a propriedades antimicrobianas com a fotoativação promovida pelo laser sobre o agente fotossensibilizador induzindo a formação de espécimes reativos de oxigênio (Takasaki et al., 2009), entretanto os efeitos bioestimulatórios da irradiação de baixa intensidade também podem ter de induzir uma aceleração da cicatrização periodontal (Oliveira et al., 2009).

Estudos com lasers de baixa intensidade tem avaliado o efeito da irradiação sobre a cicatrização de fraturas ósseas e sobre a osseointegração de implantes de titânio

(Dörtbudak et al., 2002; Guzzardella et al., 2003; Lopes et al., 2005). A irradiação com os lasers de baixa intensidade tem demonstrado acelerar a consolidação de fraturas nos ossos longos em animais e essa consolidação apresenta maior resistência a fraturas ao serem submetidas a análise biomecânica (Lirani-Galvão et al., 2006; Fávaro-Pipi et al., 2010; Oliveira et al., 2011). Também foi verificado que a irradiação a cada 48 horas entre 10-14 dias aumenta o contato do osso do hospedeiro com os implantes e o torque de remoção dos mesmos, e dessa forma acelera a osseointegração (Khadra et al., 2004; Pereira et al., 2009; Campanha et al., 2010).

Para a aplicação em baixa intensidade dois grupos de lasers tem sido utilizados de acordo com o comprimento de luz: vermelho (660nm) e infravermelho (830nm) (Cunha et al., 2009; Freddo et al., 2009). Entretanto os lasers com comprimento de onda dentro da faixa da luz infravermelha apresentam maior penetrabilidade dentro dos tecidos e por isso são preferíveis na aceleração da cicatrização óssea (Nissan et al., 2006; Jakse et al., 2007; Freddo et al., 2009), porém o seu protocolo de irradiação requer 7 sessões de irradiação, o que pode ser clinicamente inviável. Nesse contexto, aplicações únicas do laser vermelho também têm demonstrado serem efetivos no processo de regeneração óssea em estudos pré-clínicos em animais imunosuprimidos (Garcia et al., 2014; Garcia et al., 2018), com a vantagem de que apenas uma aplicação trans-cirúrgica já é efetiva na promoção de efeitos benéficos na cicatrização óssea (Garcia et al., 2014; Garcia et al., 2018). Dessa forma, existe a dúvida se realmente 7 sessões de laserterapia com comprimento de onda infravermelho é necessária para melhorar o padrão de formação óssea em áreas enxertadas com substitutos ósseos osteocondutores.

Objetivo

OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi de avaliar o efeito da LLLT com o laser infravermelho em 4 sessões sobre o reparo ósseo em áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado por meio de análise microtomográfica.

Hipótese

HIPÓTESE

H0- O laser de baixa intensidade com luz infra-vermelha aplicado em 4 sessão não irá beneficiar o reparo ósseo em áreas enxertadas com osso bovino desproteinizado.

H1- O laser de baixa intensidade com luz infra-vermelha aplicado em 4 sessão irá beneficiar o reparo ósseo em áreas enxertadas com osso bovino desproteinizado.

Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi aprovado junto ao Comitê de ética de utilização de animais da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Faculdade de Odontologia de Uberlândia, Brasil (091/18). Para esse estudo foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus*, variação Wistar) com 3 meses de idade, com peso entre 250–300 g que foram mantidos em um ambiente com temperatura ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$), humidade (65-70%), e ciclos de luz (12 horas) controlado. Os animais foram alimentados com ração apropriada e foi oferecido água e ração ad libitum. Esse estudo foi conduzido de acordo com o protocolo ARRIVE para conduta de estudos pré-clínicos.

Procedimento Cirúrgico

Após uma semana de aclimação ao ambiente do biotério, os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 8mg/Kg de massa corporal (Cloridrato de Quetamina – Francotar – Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.) e 4mg/KG massa corporal (Cloridrato de Xilazina - Virbaxyl 2% - Virbac do Brasil Ind. E Com. Ltda.), respectivamente. Posteriormente, os animais foram submetidos à tricotomia na região massetéica e submandibular e foi realizada antissepsia do campo cirúrgico com gaze estéril, embebida em solução de povidine, com o animal sendo então posicionado em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica.

Incisões horizontais foram executadas na região inferior do ramo da mandíbula e será descolado o tecido muscular e o periósteo para expor a face lateral do ramo ascendente da mandíbula dos animais. Quatro perfurações de 0.5mm de diâmetro foram executadas através de uma broca esférica. Essas perfurações foram paralelas a base da mandíbula e foram executadas a 6mm de distância uma da outra formando as arestas de um quadrado. Uma cápsula de teflon customizada no formato de um domo possuindo diâmetro externo de 5mm, altura de 2.5mm e colar periférico de 1mm foi inserida com

sua porção aberta de encontro a face lateral da mandíbula (Duas cápsulas por animal sendo uma do lado direito e outra do lado esquerdo). Foi inserido um volume de 0.032mm³ de osso bovino desproteinizado (Cerabone, Botiss, Zossen, Alemanha) compactado dentro das cápsulas, que foi posteriormente fixada na mandíbula por meio de suturas com fio de seda 4.0 que transpassaram a própria cápsula e as perfurações executadas no ramo da mandíbula (Figura 1). Os tecidos moles foram reposicionados sobre a cápsula e suturado com fio vicryl 4.0. Os animais receberam pós-operatoriamente uma dose intramuscular de pentabiótico (0.1 ml / kg) e de dipirona (0.1 ml / kg) Os animais foram sacrificados por meio de sobredosagem anestésica nos períodos de 30 e 90 dias após as cirurgias.

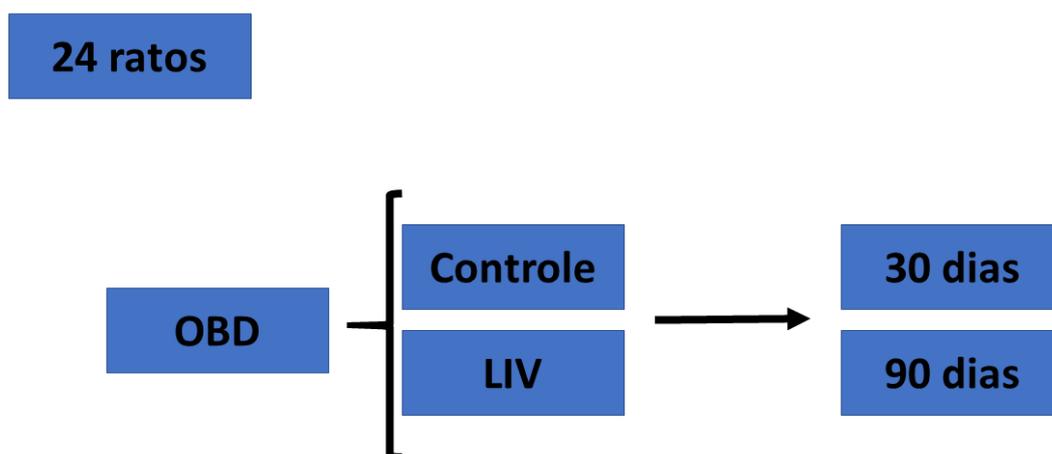
Figura 1: Condição cirúrgica após a instalação do domo de teflon preenchido com o biomaterial e adaptado a face lateral do ramo da mandíbula do rato.



Grupos

Os animais foram selecionados aleatoriamente e divididos em 2 grupos com 12 animais cada, que serão avaliados em dois períodos experimentais (30 e 90 dias), com 6 animais em cada grupo e período experimental. Os grupos foram divididos de acordo com o protocolo de LLLT utilizado para irradiar a área enxertada: CTR: Área enxertada não irradiada; IRL: Área enxertada irradiada com o infra-vermelho (Figura 2).

Figura 2: Esquema da distribuição dos animais entre os diferentes grupos e períodos experimentais.



Irradiação com Laser de Baixa intensidade infra-vermelho

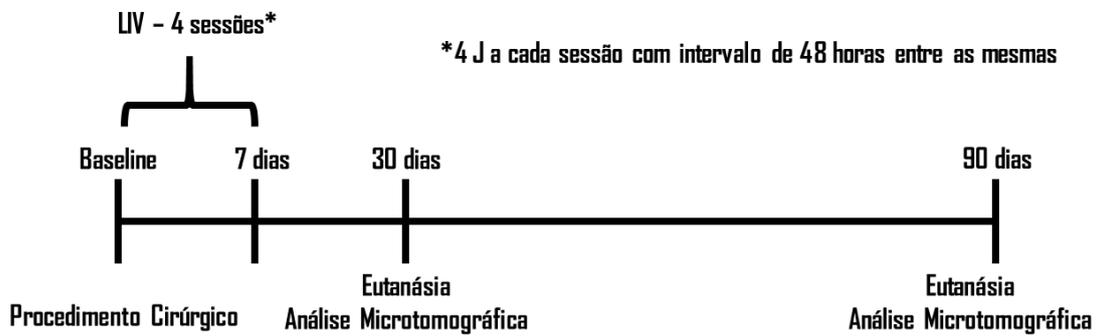
O laser de GaAlAs (TheraLase, λ 808nm, 100 mW, $\phi \sim 0.600\mu\text{m}$, divergência da ponta = 0.37rad, CW, área do spot de 0,0283 cm², DMC Equipamentos, São Carlos, SP, Brazil) foi utilizado para execução das irradiações. A área enxertada foi delimitada após as suturas do sítio cirúrgico com auxílio de uma caneta marcadora de tecido. Foram marcados 4 pontos equidistantes 3 mm de tal forma que englobasse toda a área que foi irradiada, sendo que esses pontos serviram como guia para irradiação com o laser. O laser foi irradiado transcutaneamente por 10 segundos em cada ponto, totalizando 40 segundos de irradiação por sessão. Foram executadas 4 sessões que foram repetidas a

cada 48 horas por 12 dias após as cirurgias (Oliveira et al., 2018). A energia aplicada em cada ponto foi de 1 J por ponto, o que totalizou um total de 4 J por sessão, e de 16J em todo o tratamento. A densidade de energia de irradiação utilizada foi de aproximadamente 35,33 J/cm²/ponto, 141,32 J/cm² por sessão e 565.28 J/cm² todo tratamento.

Microtomografia (μ CT)

Após os períodos de 30 e 90 dias, os animais foram eutanasiados por meio de sobredosagem anestésica (Figura 3). Os ramos das mandíbulas foram escaneados com por meio do aparelho Skyscan (SkyScan, Kontich, Bélgica) com os seguintes parâmetros: Pixel da câmera: 12.45; Potencia do tubo de raio x: 65 kVP, x-ray intensity: 385 μ A, tempo de integração: 300 ms, filtro: Al-1 mm, e tamanho do voxel: 18 μ m³. As imagens geradas foram posteriormente reconstruídas, reorientadas espacialmente e analisadas por softwares específicos (NRecon/DataViewer/CTan, Skyscan, Aartselaar, Belgium). O volume de tecidos mineralizados foi avaliado dentro de uma região de interesse (ROI) que englobou todo tecido entre o domo e a face lateral do ramo da mandíbula (BV/TV%). Um threshold na faixa de 65-250 de tons de cinza foi utilizado para avaliar o volume de tecido mineralizado dentro da ROI.

Figura 3: Fluxograma do estudo.



Análise estatística

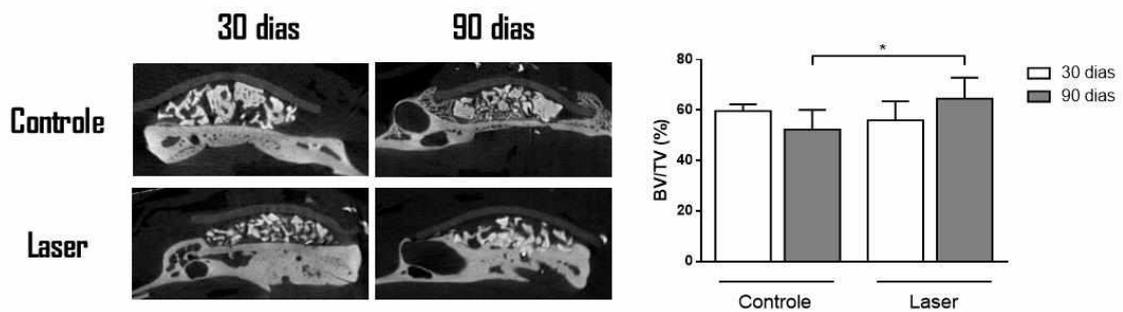
Os dados numéricos desse estudo se distribuíram de acordo com a normalidade tal como determinado pelo teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov. A comparação entre os grupos e períodos de acompanhamento foi executado por meio do teste paramétrico t-não pareado. O software Graphpad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para a aplicação dos testes estatísticos. Todos os testes foram aplicados com nível de confiança de 95%.

Resultados

RESULTADOS

Foi verificado que houve um maior quantidade de tecidos mineralizados no grupo que foi submetido a irradiação com laser infra-vermelho em 4 sessões (64.60 ± 8.31 %) comparado ao grupo que não foi submetido a irradiação (52.28 ± 7.81 %) no período de 90 dias ($p < 0.05$). A figura 4 expõe o gráfico que demonstra a média e desvio padrão dos dados de BV/TV% em todos os grupos e a imagem representativa de todos os grupos geradas pela análise microtomográfica.

Figura 4: Imagens representativas de todos os grupos geradas pela análise microtomográfica. Gráfico que demonstra a média e desvio padrão dos dados de BV/TV% * teste t-não pareado ($p < 0.05$).



Discussão

DISCUSSÃO

Áreas enxertadas com substitutos ósseos osteocondutores apresentam inferioridade biológica em relação a áreas enxertadas com osso autógeno ou cicatrizadas espontaneamente (Araújo et al., 2009; Antunes et al., 2013). Apesar desse fato, a utilização de osso autógeno nem sempre é possível em todos os casos e a manutenção volumétrica associada com a formação óssea pela manutenção do coágulo está relacionada a grandes reduções volumétricas da área previamente ocupada por tecido ósseo ou pelo dente (Antunes et al., 2013). Dessa forma, terapias que visam melhorar o padrão de formação óssea de áreas enxertadas com biomateriais osteocondutores mantendo o seu volume são necessárias para melhorar a previsibilidade da técnicas de regeneração óssea guiada (Oliveira et al., 2018; de Carvalho Silva Leocádio et al., 2021).

Foi observado nesse estudo um aumento no volume de tecidos mineralizados nas áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado irradiadas com o laser infravermelho. Apesar da análise da composição da área enxertada não ter sido executada até o momento, é provável que esse aumento de tecidos mineralizados esteja relacionado a maior formação de tecido ósseo induzido pela laserterapia pois o osso bovino desproteínizado é um biomaterial que apresenta baixas taxas de remodelação (Araújo et al., 2015; Pignaton et al., 2020). Esses achados corroboram com estudos anteriores que demonstram que a laserterapia em baixa intensidade aumenta quantidade de tecidos mineralizados em áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado e em a cerâmica bifásica (Oliveira et al., 2018), o que conseqüentemente pode estar associado a melhora no padrão de osseointegração em áreas enxertadas previamente irradiadas (Oliveira et al., 2020).

A novidade desse estudo é que os resultados de aumento de volume de tecidos mineralizados foram obtidos com um número de sessões menor do que é normalmente preconizado em relação aos protocolos de irradiação com o laser com luz infra-vermelha (Gerbi et al., 2018; Oliveira et al., 2018). Apesar do bom poder de penetrabilidade desse laser, a luz infra-vermelha tem um poder de absorção tecidual menor que a luz vermelha, o que influencia na maior quantidade de sessões de irradiação para o laser infra-vermelho (7 sessões) possa induzir respostas significativas na formação óssea (Freddo et al., 2009; Gerbi et al., 2018; Oliveira et al., 2018). Caso o laser infra-vermelho realmente produza respostas semelhantes com menores números de sessões, a adesão dos pacientes ao tratamento pode ser melhor já que maiores quantidades de visitas ao dentista pode desestimular a ida dos pacientes aos consultórios para serem submetidos as sessões de laserterapia.

Os benefícios do laser de baixa potência na cicatrização de feridas são explicados ao se considerar vários mecanismos biológicos básicos, inclusive a indução de expressão de citocinas e fatores de crescimento, que são responsáveis por muitas fases da cicatrização (Metin et al., 2018). O laser de baixa intensidade aumenta a expressão de fatores de crescimento, como TGF- β , que, por sua vez, induz deposição de matriz extracelular (Oliveira et al., 2017); incrementa proliferação celular no local da lesão (Oliveira et al., 2020); aumenta quantidade de vasos sanguíneos e promove cicatrização mais organizada (Metin et al., 2018). Também foi relatado que a terapia com laser de baixa intensidade aumenta a atividade dos osteoblastos e osteoclastos, estimula a produção da matriz óssea na formação de calos ósseos e também acelera a dinâmica da matriz óssea, modificando a expressão dos componentes da matriz extracelular e aumentando a área de neoformação óssea, o que reduz o tempo necessário para o reparo ósseo (Metin et al., 2018; Oliveira et al., 2018).

Conclusão

CONCLUSÃO

A aplicação da LLLT com luz infra-vermelha em 4 sessões promoveu maior volume de tecidos mineralizados em áreas enxertadas com osso bovino desproteinizado.

Referências

REFERÊNCIAS

- 1) Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Binderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *J Oral Rehabil.* 2006 Aug;33(8):619-924.
- 2) Kim YD, Kim SS, Hwang DS, Kim SG, Kwon YH, Shin SH, Kim UK, Kim JR, Chung IK. Effect of low-level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. *Lasers Surg Med.* 2007 Jun;39(5):441-50.
- 3) Park JJ, Kang KL. Effect of 980-nm GaAlAs diode laser irradiation on healing of extraction sockets in streptozotocin-induced diabetic rats: a pilot study. *Lasers Med Sci.* 2012 Jan;27(1):223-30.
- 4) Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, Sculean A, Wang CY, Koshy G, Romanos G, Ishikawa I, Izumi Y. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontol 2000.* 2009;51:109-40.
- 5) Lopes CB, Pinheiro AL, Sathaiah S, Duarte J, Cristinamartins M. Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a Raman spectroscopic study. *Photomed Laser Surg.* 2005 Feb;23(1):27-31.
- 6) AboElsaad NS, Soory M, Gadalla LM, Ragab LI, Dunne S, Zalata KR, Louca C. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of bone defects (an experimental study). *Lasers Med Sci.* 2009 Jul;24(4):527-33.
- 7) Cunha CB, Eduardo FP, Zezell DM, Bezinelli LM, Shitara PP, Correa L. Effect of irradiation with red and infrared laser in the treatment of oral mucositis: a pilot study with patients undergoing chemotherapy with 5-FU. *Lasers Med Sci.* 2012 Nov;27(6):1233-40.

- 8) Dörtbudak O, Haas R, Mailath-Pokorny G. Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Jun;13(3):288-92.
- 9) Guzzardella GA, Torricelli P, Nicoli-Aldini N, Giardino R. Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an in vivo comparative study. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Apr;14(2):226-32.
- 10) Pereira CL, Sallum EA, Nociti FH Jr, Moreira RW. The effect of low-intensity laser therapy on bone healing around titanium implants: a histometric study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009 Jan-Feb;24(1):47-51.
- 11) Campanha BP, Gallina C, Geremia T, Loro RC, Valiati R, Hübler R, de Oliveira MG. Low-level laser therapy for implants without initial stability. *Photomed Laser Surg.* 2010 Jun;28(3):365-9.
- 12) de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Garlet GP, de Souza RF, Taba M, Scombatti de Souza SL, Ribeiro FJ. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol.* 2009 Jan;80(1):98-105.
- 13) Lirani-Galvão AP, Jorgetti V, da Silva OL. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed Laser Surg.* 2006 Dec;24(6):735-40.
- 14) Fávaro-Pípi E, Feitosa SM, Ribeiro DA, Bossini P, Oliveira P, Parizotto NA, Renno AC. Comparative study of the effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on bone defects in tibias of rats. *Lasers Med Sci.* 2010 Sep;25(5):727-32.
- 15) Oliveira P, Sperandio E, Fernandes KR, Pastor FA, Nonaka KO, Renno AC. Comparison of the effects of low-level laser therapy and low-intensity pulsed

- ultrasound on the process of bone repair in the rat tibia. *Rev Bras Fisioter.* 2011 May-Jun;15(3):200-5.
- 16) Khadra M, Rønold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haanaes HR. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Jun;15(3):325-32.
 - 17) Freddo AL, Rodrigo SM, Massotti FP, Etges A, de Oliveira MG. Effect of low-level laser therapy after implantation of poly-L-lactic/polyglycolic acid in the femurs of rats. *Lasers Med Sci.* 2009 Sep;24(5):721-8.
 - 18) Jakse N, Payer M, Tangl S, Berghold A, Kirmeier R, Lorenzoni M. Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation. An experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Aug;18(4):517-24.
 - 19) Garcia VG, Sahyon AS, Longo M, Fernandes LA, Gualberto Junior EC, Novaes VC, Ervolino E, de Almeida JM, Theodoro LH. Effect of LLLT on autogenous bone grafts in the repair of critical size defects in the calvaria of immunosuppressed rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014 Oct;42(7):1196-202.
 - 20) Garcia VG, Gualberto EC Júnior, Ervolino E, Nagata MJH, de Almeida JM, Theodoro LH. aPDT for periodontitis treatment in ovariectomized rats under systemic nicotine. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018 Jun;22:70-78.
 - 21) de Oliveira GJPL, Aroni MAT, Medeiros MC, Marcantonio E Jr, Marcantonio RAC. Effect of low-level laser therapy on the healing of sites grafted with coagulum, deproteinized bovine bone, and biphasic ceramic made of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate. In vivo study in rats. *Lasers Surg Med.* 2018 Jan 13. doi: 10.1002/lsm.22787. Epub ahead of print.

- 22) Araújo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 2009 May;20(5):433-40.
- 23) Antunes AA, Oliveira Neto P, de Santis E, Caneva M, Botticelli D, Salata LA. Comparisons between Bio-Oss(®) and Straumann(®) Bone Ceramic in immediate and staged implant placement in dogs mandible bone defects. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Feb;24(2):135-42.
- 24) de Carvalho Silva Leocádio A, Silva Júnior M, José Pimentel Lopes de Oliveira G, Marcantonio Júnior É. Osseointegration of different implant surfaces in areas grafted with deproteinized bovine bone associated or not with fresh bone marrow - Preclinical study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2021 Mar 22. doi: 10.1111/clr.13746. Epub ahead of print.
- 25) Araújo MG, da Silva JCC, de Mendonça AF, Lindhe J. Ridge alterations following grafting of fresh extraction sockets in man. A randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2015 Apr;26(4):407-412.
- 26) Pignaton TB, Spin-Neto R, Ferreira CEA, Martinelli CB, de Oliveira GJPL, Marcantonio E Jr. Remodelling of sinus bone grafts according to the distance from the native bone: A histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2020 Oct;31(10):959-967.
- 27) de Oliveira GJPL, Aroni MAT, Pinotti FE, Marcantonio E Jr, Marcantonio RAC. Low-level laser therapy (LLLT) in sites grafted with osteoconductive bone substitutes improves osseointegration. *Lasers Med Sci.* 2020 Sep;35(7):1519-1529.
- 28) Gerbi MEMM, Miranda JM, Arruda JAA, Moreno LMM, Carneiro VSM, Brasilino NC, Menezes RF, Brugnera Junior A, Pinheiro ALB. Photobiomodulation Therapy in Bone Repair Associated with Bone Morphogenetic Proteins and Guided Bone

Regeneration: A Histomorphometric Study. *Photomed Laser Surg.* 2018 Nov;36(11):581-588. doi: 10.1089/pho.2017.4421. PMID: 30422755.

- 29) Metin R, Tatli U, Evlice B. Effects of low-level laser therapy on soft and hard tissue healing after endodontic surgery. *Lasers Med Sci.* 2018 Nov;33(8):1699-1706. doi: 10.1007/s10103-018-2523-8. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29713842.
- 30) de Oliveira LSS, de Araújo AA, de Araújo Júnior RF, Barboza CAG, Borges BCD, da Silva JSP. Low-level laser therapy (780 nm) combined with collagen sponge scaffold promotes repair of rat cranial critical-size defects and increases TGF- β , FGF-2, OPG/RANK and osteocalcin expression. *Int J Exp Pathol.* 2017 Apr;98(2):75-85. doi: 10.1111/iep.12226. Epub 2017 May 29. PMID: 28556971; PMCID: PMC5485360.

Anexo

ANEXO: Certificado do CEUA/UFU



Universidade Federal de Uberlândia

- Comissão de Ética na Utilização de Animais -



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Associação da laserterapia em baixa intensidade e das proteínas derivadas da matriz do esmalte com biomateriais osteocondutores: Estudo pré-clínico em ratos", protocolo nº 091/18, sob a responsabilidade de **Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião 23 de novembro de 2018.

(We certify that the project entitled intitulado "Associação da laserterapia em baixa intensidade e das proteínas derivadas da matriz do esmalte com biomateriais osteocondutores: Estudo pré-clínico em ratos", protocol 091/18, under the responsibility of **Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira** involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of november 23th, 2018).

Vigência do Projeto	Início: 01/02/2019 Término: 30/12/2021
Especie Linhagem Grupos Taxonômicos	Rato heterogênico/ Wistar
Numero de animais	48
Peso/Idade	300g/ 18 semanas
Sexo	Macho
Origem Local	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia
Local onde serão mantidos os animais:	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia

Uberlândia, 30 de novembro de 2018

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU