



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE ODONTOLOGIA



NATHÁLIA FARIAS DE OLIVEIRA

Proteínas da matriz do esmalte na formação de tecido mineralizado em áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado

UBERLÂNDIA
2021

NATHÁLIA FARIAS DE OLIVEIRA

Proteínas da matriz do esmalte na formação de tecido mineralizado em áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado

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. Guilherme José Pimentel
Lopes de Oliveira**

UBERLÂNDIA
2021

Sumário

Resumo.....	5
Abstract.....	7
1.Introdução.....	9
2.Objetivo.....	12
3.Hipótese.....	14
4.Material e Métodos.....	16
4.1 Procedimento cirúrgico.....	16
4.2 Grupos.....	17
4.3 Análise microtomográfica.....	17
4.4 Análise Estatística.....	17
5.Resultados.....	19
6.Discussão.....	21
7.Conclusão.....	24
Referências.....	26
Anexos.....	31

RESUMO

Resumo

Esse estudo avaliou o efeito da associação das proteínas derivadas da matriz do esmalte com osso bovino desproteínizado na formação de tecidos mineralizados, por meio de análise microtomográfica, na face lateral de mandíbulas de ratos. Foram utilizados nesse estudo 24 ratos que foram distribuídos em dois grupos de acordo com a associação de biomateriais utilizados no procedimento de enxertia: CTR: Osso bovino desproteínizado. EDM: Associação do osso bovino desproteínizado com as proteínas derivadas da matriz do esmalte. O procedimento cirúrgico consistiu em abertura de retalho e exposição da face lateral da mandíbula dos animais que posteriormente foi submetida a adaptação de uma membrana de teflon em formato de domo que foi preenchida com o osso bovino desproteínizado e a proteína derivadas da matriz do esmalte. Os animais foram eutanasiados em dois períodos experimentais (30 e 90 dias, n=6 animais), e suas mandíbulas foram escaneadas em microtomógrafo. Essa metodologia foi aplicada para avaliar o volume de tecido mineralizado que se encontrava entre a membrana de teflon e a mandíbula em porcentagem. Foi verificado que grupo CTR apresentou volume de tecido mineralizado de 63.32 ± 7.15 % aos 30 dias e de 59.69 ± 11.24 % aos 90 dias, enquanto que o grupo EDM apresentou de tecido mineralizado de 60.14 ± 3.69 % aos 30 dias e de 67.62 ± 9.74 % aos 90 dias. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. As proteínas da matriz do esmalte não influenciaram na formação de tecidos mineralizados em áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado.

Palavras-Chaves: Proteínas do Esmalte Dentário, regeneração, substitutos ósseos.

ABSTRACT

Abstract

This study evaluated the effect of the association of the enamel derivate matrix proteins (EMD) with deproteinized bovine bone (DBB) in the formation of mineralized tissues, through microtomographic analysis on rat jaws. In this study, 24 rats were divided into two groups according to the association of biomaterials used in the grafting procedure: DBB: Deproteinized bovine bone. EMD: Association of the DBB with EMD. The surgical procedure consisted of opening a flap and exposing the lateral face of the mandibles, which were later submitted to the adaptation of a dome-shape Teflon membrane. This membrane was filled with the DBB and EMD. The animals were euthanized in two experimental periods (30 and 90 days, n=6 animals), and their jaws were scanned in a micro-CT scanner. This methodology was applied to evaluate the volume of mineralized tissue that was found between the membrane and the mandible in percentage. It was verified that the DBB group presented a volume of mineralized tissue of $63.32 \pm 7.15\%$ at 30 days and $59.69 \pm 11.24\%$ at 90 days, while the EMD group presented a mineralized tissue volume of $60.14 \pm 3.69\%$ at 30 days and $67.62 \pm 9.74\%$ at 90 days. There were no statistically significant differences between groups. EMD did not influence the formation of mineralized tissues in areas grafted with DBB.

key-words: bone substitutes, enamel derivate matrix proteins, regeneration.

INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

Atualmente o tratamento da perda dentária com implantes osseointegrados tem sido aplicado de forma corriqueira e com grandes taxas de sucesso independente do tipo de edentulismo apresentado (Kwon et al., 2014; Ravida et al., 2019). Porém, sabe-se que para o sucesso dos implantes dentários é indispensável o processo de osseointegração, que é dependente de muito fatores, incluindo um leito ósseo que permita boa estabilidade primária e conversão da estabilidade secundária dos implantes (Malchiodi et al., 2016; Barbosa et al., 2021). A reabsorção óssea é um problema recorrente da perda dentária (Araújo et al., 2019), mas é importante lembrar que ela também pode ser resultado de várias patologias (Abramowicz et al., 2021), trauma (Kazi et al., 2019) ou consequência de procedimentos cirúrgicos (Brown et al., 2016). Devido a isso, muitos pacientes podem apresentar tecido ósseo insuficiente para instalação dos implantes (Spin Neto et al., 2015).

Devido isso, se faz necessário a aplicação de técnicas de regeneração óssea guiada que permitam a instalação de implantes em posição adequada (Benic & Hämmerle, 2014). Vários materiais substitutos de tecido ósseo tem sido indicados como componentes nessa técnica (Mordenfeld et al., 2016; Smith et al., 2018), sendo que enxerto de osso autógeno é considerado o padrão ouro por apresentar maiores propriedades biológicas que os outros tipos de enxerto (Spin Neto et al., 2015), entretanto, embora esse tipo de enxerto seja considerado o padrão ouro pela literatura existem algumas limitações relacionadas a utilização do mesmo – há necessidade de uma área doadora, fonte limitada, altas taxas de reabsorção especialmente quando o mesmo é utilizado na forma particulada (Nkenke & Neukam, 2014).

Biomateriais substitutos de tecido ósseo estritamente osteocondutores tem sido indicados como alternativas a utilização de enxerto de osso autógeno e vem apresentando bons resultados clínicos especialmente em defeitos favoráveis tais como em alvéolos pós-extração (Torine et al., 2018) e em cirurgias de elevação de soalho do seio maxilar (Li et al., 2018). Entretanto, existem algumas limitações no uso desses biomateriais especialmente em áreas com defeitos não-favoráveis (eg. rebordo edêntulo atrofico) (Urban et al., 2013) e redução de formação óssea em comparação a defeitos que cicatrizarão espontaneamente ou enxertados com enxerto de osso autógeno (Araújo & Lindhe, 2009; Antunes et al., 2013).

Nesse sentido, algumas estratégias tem sido aplicadas com intuito de melhorar a propriedade biológica desses substitutos ósseos. A mistura de enxertos osteocondutores com enxerto de osso autógeno tem demonstrado aumentar a previsibilidade em cirurgias de

regeneração óssea guiada (Urban et al., 2013) e acelerar a formação óssea nas áreas enxertadas (Jensen et al., 2013), porém essa associação não é interessante devido as limitações supracitadas em relação ao uso do enxerto de osso autógeno (Nkenke & Neukam, 2014; Spin Neto et al., 2015). Associação de enxertos osteocondutores com concentrados sanguíneos (Pichotano et al., 2019) e fatores de crescimento tal como da BMP2 (Schmitt et al., 2013) também tem sido investigados, mas com resultados conflitantes ou com inadequada relação custo-benefício (Kao et al., 2012; Nizam et al., 2018).

As proteínas derivadas da matriz do esmalte tem sido utilizadas tradicionalmente em Periodontia para tratamento regenerativo de defeitos intraósseos periodontais (Ogihara & Tarnow, 2014), lesões de furca (Queiroz et al., 2016) e recobrimento de retrações gengivais (Rocha dos Santos et al., 2017). Essas proteínas são produzidas pela bainha epitelial de Hertwig, um composto do órgão do esmalte e tem função importante na formação do cimento radicular durante a fase de formação das raízes dentárias (Rocha dos Santos et al., 2017; Miron et al., 2017). Entretanto, recentemente tem sido proposto que essas proteínas também podem atuar beneficiando a formação de tecido ósseo (Miron et al., 2016; Miron et al., 2017).

OBJETIVO

2.OBJETIVO

O objetivo desse estudo será de avaliar o efeito da associação das proteínas derivadas da matriz de esmalte sobre a formação de tecido mineralizado em áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado.

HIPÓTESE

3.HIPÓTESE

H0- A proteína derivada da matriz do esmalte não irá alterar o padrão de formação de tecidos mineralizados em áreas enxertadas com osso bovino desproteinizado;

H1- A proteína derivada da matriz do esmalte irá alterar o padrão de formação de tecidos mineralizados em áreas enxertadas com osso bovino desproteinizado.

MATERIAL E MÉTODOS

4.MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi submetido e aprovado junto ao Comitê de ética de utilização de animais da Universidade Federal de Uberlândia – UFU (CEUA 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 ($21\pm 1^\circ\text{C}$), umidade (65-70%), e ciclos de luz (12 horas) controlados. 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.

4.1 Procedimento Cirúrgico

Após um mês de aclimação ao ambiente do biotério, os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 8 mg/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 bilateralmente 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 foi executado o descolado o tecido muscular e o periósteo para expor a face lateral do ramo ascendente da mandíbula dos animais. Quatro perfurações de 0.5 mm 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 0.032mm^3 de osso bovino desproteínizado (Cerabone, Botiss, Zossen, Alemanha) associado ou não com proteínas derivadas da matriz do esmalte 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. Os tecidos moles foram reposicionados sobre a cápsula e suturado com fio vicryl 4.0. Os animais receberam no pós-operatório uma dose intramuscular de pentabiótico (0.1 ml / kg) e de dipirona (0.1 ml / kg) Os animais foram eutanasiados por meio de

sobredosagem anestésica nos períodos de 30 e 90 dias após as cirurgias. Um dos lados da mandíbula dos animais foram utilizados para execução da análise microtomográfica referente a esse trabalho de pesquisa.

4.2 Grupos

Os 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 tipo de associação de enxerto utilizado: **Grupo CTR:** Cápsula preenchida com osso bovino desproteínizado (OBD); Grupo **EMD:** Cápsula preenchida OBD associado a proteínas da matriz do esmalte (EMD).

4.3 Análise Microtomográfica

Após a eutanásia, os ramos das mandíbulas foram fixados em paraformaldeído a 4% por 48 horas e depois foram mantidos em álcool 70° até o momento dos escaneamentos dos mesmos no microtomógrafo. Os ramos das mandíbulas foram escaneados 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, intensidade de raio-x: 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. Um threshold na faixa de 65-250 de tons de cinza foi utilizado para avaliar o volume de tecido mineralizado dentro do ROI (BV/TV%).

4.4 Análise Estatística

Os dados desse estudo se distribuíram de forma normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. Dessa forma, o teste t-não pareado foi aplicado para avaliação dos dados de BV/TV% desse estudo comparando-se os dois grupos de tratamento dentro de cada período experimental e os dois períodos experimentais dentro de cada grupo de tratamento. O software GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para aplicação de todos os testes estatísticos que foram utilizados considerando o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

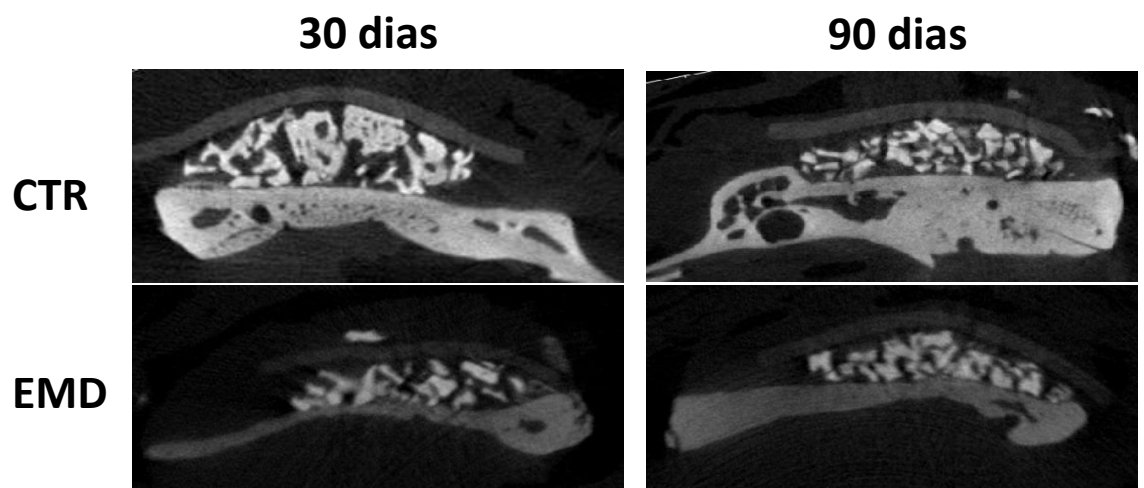
5.RESULTADOS

Foi verificado que grupo CTR apresentou volume de tecido mineralizado de 63.32 ± 7.15 % aos 30 dias e de 59.69 ± 11.24 % aos 90 dias, enquanto que o grupo EMD apresentou de tecido mineralizado de 60.14 ± 3.69 % aos 30 dias e de 67.62 ± 9.74 % aos 90 dias. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Tabela 1). A imagens representativas da análise microtomográfica estão expostas na figura 1.

Tabela 1: Dados de média e desvio padrão da análise de BV/TV% em ambos os grupos e períodos experimentais. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

BV/TV %	30 dias	90 dias
Controle	63.32 ± 7.15	59.69 ± 11.24
EMD	60.14 ± 3.69	67.62 ± 9.74

Figura 1. Imagens representativas da análise microtomográfica onde é possível notar semelhanças no aspecto tomográfico das áreas enxertadas em todos os momento de avaliação, o que significa que a utilização do EMD não influenciou o volume de tecidos mineralizadas de áreas enxertadas com OBD.



DISCUSSÃO

6.DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi de avaliar o potencial das proteínas derivadas da matriz do esmalte na formação de tecido mineralizado em combinação com um material de enxerto ósseo xenógeno de origem bovina. A associação de fatores de crescimento com substitutos ósseos osteocondutores tem sido investigado como uma abordagem para acelerar ou melhorar a cicatrização nas áreas enxertadas com esses materiais. Entretanto, no presente estudo, a aplicação da proteína da matriz do esmalte não interferiu no volume da área enxerta, dessa forma a hipótese nula foi rejeitada.

As proteínas derivadas da matriz do esmalte foram primeiramente indicadas em técnicas cirurgias de regeneração tecidual guiada com objetivo de tratar defeitos intraósseos periodontais (Fileto Mazzonetto et al., 2021) ou lesões de furca (Queiroz et al., 2016). De fato, as proteínas da matriz do esmalte têm demonstrado reduzir a profundidade de sondagem associado a ganhos de inserção clínica em estudos clínicos (Ogihara & Tarnow, 2014; Fileto Mazzonetto et al., 2021). Entretanto, ao se comparar o preenchimento de defeitos periodontais infra-ósseos com osso bovino desproteínizado associado ou não as proteínas derivadas da matriz do esmalte, foi verificado que não houve diferenças radiográficas no preenchimento dos defeitos e clínicas em relação aos parâmetros periodontais entre os grupos (Scheyer et al., 2002), o que está de acordo com o resultado desse estudo que demonstrou que não houve alterações no volume de tecidos mineralizados em áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado quando a proteína derivada da matriz do esmalte foi aplicada

A ausência de interferência no volume dos tecidos mineralizados induzidos pela proteína derivada da matriz do esmalte pode significar que a utilização do osso bovino desproteínizado não depende de associações para promover bons resultados clínicos. Estudos clínicos anteriores têm demonstrado a eficiência do enxerto de osso bovino desproteínizado no tratamento de defeitos ósseos (Sculean et al., 2005; Zhao et al., 2018) devido ao seu bom potencial osteocondutor (Cordaro et al., 2008) associado a uma taxa de reabsorção baixa, que torna esse material eficiente na obtenção e estabilidade volumétrica em áreas enxertadas (Sculean et al., 2005; Antunes et al., 2013; Zhao et al., 2018). Dessa forma, a estabilidade volumétrica que foi avaliada nesse estudo parece não um ponto crítico na utilização do osso bovino desproteínizado e pode ser outra justificativa para ausência de efeitos da proteína derivada da matriz do esmalte nesse parâmetro.

A análise por micro CT apresenta limitações de análise já que não é possível separar a neoformação óssea das partículas de biomateriais ainda existentes. Dessa forma, não pode ser descartado que a aplicação de proteína derivada da matriz do esmalte possa ter aumentado a formação de tecido ósseo nas áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado. De fato, um estudo pré-clínico onde foi testado a associação da proteína derivada da matriz do esmalte com o osso bovino desproteínizado em modelo de calvaria de coelhos demonstrou que a associação desses materiais promoveu maior formação óssea na área enxertadas após 8-12 semanas do que a utilização isolada desses materiais (Shahriari et al., 2012).

Esse estudo apresenta limitações que devem ser levadas em consideração ao se avaliar nossos achados. A ausência da análise histológica não possibilitou avaliar a qualidade da área enxertada, separando dentro do volume obtido o percentual ocupado por osso e partículas remanescentes de osso bovino desproteínizado. A quantidade de proteína utilizada também pode não ter sido a ideal, apesar de ter sido seguido a recomendação do material ser banhado com a proteína de forma integral. Além disso, outros produtos a base de proteínas derivadas da matriz do esmalte purificados com a porção proteica relacionado especificamente com a formação de osso foram desenvolvidos e podem ter potencial de formação óssea maior que o produto utilizado nessa pesquisa.

CONCLUSÃO

7.CONCLUSÃO

As proteínas da matriz do esmalte não influenciaram na formação de tecidos mineralizados em áreas enxertadas com osso bovino desproteinizado.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1) Kwon T, Bain PA, Levin L. Systematic review of short- (5-10 years) and long-term (10 years or more) survival and success of full-arch fixed dental hybrid prostheses and supporting implants. *J Dent.* 2014 Oct;42(10):1228-41.
- 2) Ravidà A, Tattan M, Askar H, Barootchi S, Tavelli L, Wang HL. Comparison of three different types of implant-supported fixed dental prostheses: A long-term retrospective study of clinical outcomes and cost-effectiveness. *Clin Oral Implants Res.* 2019 Apr;30(4):295-305.
- 3) Malchiodi L, Balzani L, Cucchi A, Ghensi P, Nocini PF. Primary and Secondary Stability of Implants in Postextraction and Healed Sites: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2016 Nov/Dec;31(6):1435-1443.
- 4) Barbosa PP, Cruvinel TM, Sakakura CE, Pimentel Lopes de Oliveira GJ, Zuza EC. Primary and Secondary Stability of Implants with Hydrophilic Surfaces in the Posterior Maxilla: A Split-Mouth Randomized Controlled Clinical Trial. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2021 Jul-Aug;36(4):787-792.
- 5) Araújo MG, Silva CO, Souza AB, Sukekava F. Socket healing with and without immediate implant placement. *Periodontol 2000.* 2019 Feb;79(1):168-177.
- 6) Abramowicz S, Goudy SL, Mitchell CE, Prickett K, Marchica C, Austin TM, El-Deiry MW. A Protocol for Resection and Immediate Reconstruction of Pediatric Mandibles Using Microvascular Free Fibula Flaps. *J Oral Maxillofac Surg.* 2021 Feb;79(2):475-482.
- 7) Kazi AA, Lee TS, Vincent A, Sokoya M, Sheen D, Ducic Y. The Role of External Fixation in Trauma and Reconstruction of the Mandible in the Age of Rigid Fixation. *Facial Plast Surg.* 2019 Dec;35(6):614-622.
- 8) Brown JS, Barry C, Ho M, Shaw R. A new classification for mandibular defects after oncological resection. *Lancet Oncol.* 2016 Jan;17(1):e23-30
- 9) Spin-Neto R, Stavropoulos A, Coletti FL, Pereira LA, Marcantonio E Jr, Wenzel A. Remodeling of cortical and corticocancellous fresh-frozen allogeneic block bone grafts--a radiographic and histomorphometric comparison to autologous bone grafts. *Clin Oral Implants Res.* 2015 Jul;26(7):747-52.
- 10) Benic GI, Hämmerle CH. Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration. *Periodontol 2000.* 2014 Oct;66(1):13-40. doi: 10.1111/prd.12039. PMID: 25123759.
- 11) Mordenfeld A, Lindgren C, Hallman M. Sinus Floor Augmentation Using Straumann® BoneCeramic™ and Bio-Oss® in a Split Mouth Design and Later Placement of Implants: A 5-Year Report from a Longitudinal Study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016 Oct;18(5):926-936.
- 12) Smith MM, Duncan WJ, Coates DE. Attributes of Bio-Oss® and Moa-Bone® graft materials in a pilot study using the sheep maxillary sinus model. *J Periodontal Res.* 2018 Feb;53(1):80-90.
- 13) Nkenke E, Neukam FW. Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. *Eur J Oral Implantol.* 2014 Summer;7 Suppl 2:S203-17.
- 14) Tirone F, Salzano S, Pagano M. Histologic and Radiographic Analysis of Nonhealing Extraction Sockets Treated with Bio-Oss Collagen After a 4-Month Healing Period: A Prospective Descriptive Study in Humans. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2019 July/August;39(4):561-568.
- 15) Li P, Zhu H, Huang D. Autogenous DDM versus Bio-Oss granules in GBR for immediate implantation in periodontal postextraction sites: A prospective clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2018 Dec;20(6):923-928.

- 16) Urban IA, Nagursky H, Lozada JL, Nagy K. Horizontal ridge augmentation with a collagen membrane and a combination of particulated autogenous bone and anorganic bovine bone-derived mineral: a prospective case series in 25 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2013 May-Jun;33(3):299-307.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) Jensen T, Schou S, Gundersen HJ, Forman JL, Terheyden H, Holmstrup P. Bone-to-implant contact after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios in mini pigs. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Jun;24(6):635-44.
- 20) Pichotano EC, de Molon RS, de Souza RV, Austin RS, Marcantonio E, Zandim-Barcelos DL. Evaluation of L-PRF combined with deproteinized bovine bone mineral for early implant placement after maxillary sinus augmentation: A randomized clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2019 Apr;21(2):253-262.
- 21) Schmitt C, Lutz R, Doering H, Lell M, Ratky J, Schlegel KA. Bio-Oss® blocks combined with BMP-2 and VEGF for the regeneration of bony defects and vertical augmentation. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Apr;24(4):450-60.
- 22) Kao DW, Kubota A, Nevins M, Fiorellini JP. The negative effect of combining rhBMP-2 and Bio-Oss on bone formation for maxillary sinus augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2012 Feb;32(1):61-7.
- 23) Nizam N, Eren G, Akcalı A, Donos N. Maxillary sinus augmentation with leukocyte and platelet-rich fibrin and deproteinized bovine bone mineral: A split-mouth histological and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res.* 2018 Jan;29(1):67-75. doi: 10.1111/clr.13044. Epub 2017 Aug 8. PMID: 28786494.
- 24) Ogihara S, Tarnow DP. Efficacy of enamel matrix derivative with freeze-dried bone allograft or demineralized freeze-dried bone allograft in intrabony defects: a randomized trial. *J Periodontol.* 2014 Oct;85(10):1351-60.
- 25) Queiroz LA, Santamaria MP, Casati MZ, Ruiz KS, Nociti F Jr, Sallum AW, Sallum EA. Enamel matrix protein derivative and/or synthetic bone substitute for the treatment of mandibular class II buccal furcation defects. A 12-month randomized clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2016 Sep;20(7):1597-606.
- 26) Rocha Dos Santos M, Sangiorgio JPM, Neves FLDS, França-Grohmann IL, Nociti FH Jr., Silverio Ruiz KG, Santamaria MP, Sallum EA. Xenogenous Collagen Matrix and/or Enamel Matrix Derivative for Treatment of Localized Gingival Recessions: A Randomized Clinical Trial. Part II: Patient-Reported Outcomes. *J Periodontol.* 2017 Dec;88(12):1319-1328.
- 27) Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Buser D, Zhang Y, Bosshardt DD, Sculean A. Combination of Collagen Barrier Membrane with Enamel Matrix Derivative-Liquid Improves Osteoblast Adhesion and Differentiation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2017 Jan/Feb;32(1):196-203.
- 28) Miron RJ, Chandad F, Buser D, Sculean A, Cochran DL, Zhang Y. Effect of Enamel Matrix Derivative Liquid on Osteoblast and Periodontal Ligament Cell Proliferation and Differentiation. *J Periodontol.* 2016 Jan;87(1):91-9.
- 29) Fileto Mazzone AL, Casarin RCV, Santamaria MP, Andere NMRB, Araújo CF, Videira Clima da Silva R, Purisaca JEV, Sallum EA, Sallum AW. Clinical, radiographic, and patient-centered outcomes after use of enamel matrix proteins for the treatment of

- intrabony defects in patients with aggressive periodontitis: A 12-month multicenter clinical trial. *J Periodontol.* 2021 Jul;92(7):995-1006.
- 30) Scheyer ET, Velasquez-Plata D, Brunsvold MA, Lasho DJ, Mellonig JT. A clinical comparison of a bovine-derived xenograft used alone and in combination with enamel matrix derivative for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Periodontol.* 2002 Apr;73(4):423-32.
 - 31) Sculean A, Chiantella GC, Windisch P, Arweiler NB, Brex M, Gera I. Healing of intrabony defects following treatment with a composite bovine-derived xenograft (Bio-Oss Collagen) in combination with a collagen membrane (Bio-Gide PERIO). *J Clin Periodontol.* 2005 Jul;32(7):720-4.
 - 32) Zhao L, Xu T, Hu W, Chung KH. Preservation and augmentation of molar extraction sites affected by severe bone defect due to advanced periodontitis: A prospective clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2018 Jun;20(3):333-344.
 - 33) Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Aug;19(8):796-803.
 - 34) Shahriari S, Houshmand B, Razavian H, Khazaei S, Abbas FM. Effect of the combination of enamel matrix derivatives and deproteinized bovine bone materials on bone formation in rabbits' calvarial defects. *Dent Res J (Isfahan).* 2012 Jul;9(4):422-6.

ANEXO



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
Espécie/Linhagem/Grupos Taxonômicos	Rato heterogêneo/ Wistar
Número 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