



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



ANDRESSA RAMOS SILVA

**Associação da laserterapia em baixa
intensidade e das proteínas derivadas da
matriz do esmalte com biomateriais
osteocondutores: Estudo pré-clínico em
ratos**

UBERLÂNDIA

2022

ANDRESSA RAMOS SILVA

**ASSOCIAÇÃO DA LASERTERAPIA DE
BAIXA INTENSIDADE E DAS PROTEÍNAS
DERIVADAS DA MATRIZ DE ESMALTE COM
BIOMATERIAIS OSTEOCONDUTORES:
ESTUDO PRÉ-CLÍNICO EM RATOS**

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

UBERLÂNDIA

2022

SUMÁRIO

Resumo	03
Abstract	04
Introdução	05
Objetivo	07
Hipótese	08
Materiais e métodos	09
Resultados	13
Discussão	14
Conclusão	16
Referências bibliográficas	17
Anexos	22

RESUMO

O objetivo desse estudo foi de avaliar se a associação da Laserterapia em baixa intensidade com laser infravermelho (LLLT) e das proteínas derivadas da matriz do esmalte (EMD) melhoram o reparo de áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado (OBD). Para esse estudo foram utilizados 24 ratos. Esses animais foram aleatoriamente alocados 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 tratamento aplicado nas áreas enxertadas: **Grupo 1:** Cápsula preenchida OBD que foi associada a proteína derivada da matriz do esmalte (EMD); **Grupo 2:** Cápsula preenchida OBD associado a EMD + LLLT. Foram instalados bilateralmente no ramo da mandíbula de cada animal uma cápsula de teflon em forma de domo, que foi preenchido com OBD 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. Foram executadas análises microtomográficas para avaliação do volume do tecido mineralizado. Foi verificado que as áreas enxertadas e tratadas com EMD associado a LLLT apresentaram maiores quantidades de tecidos mineralizados do que o grupo onde as áreas enxertadas com OBD foram tratadas apenas com EMD em ambos os períodos experimentais. A laserterapia associado ao EMD promove maior volume de tecidos mineralizados do que a utilização isolada do EMD em áreas enxertadas com OBD.

Palavras-Chave: Estudo pré-clínico; Laser de baixa intensidade; Reparo ósseo; Substitutos ósseos

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate whether the association of low-level laser therapy with infrared laser (LLLT) and enamel matrix-derived proteins (EMD) improves the repair of grafted areas with deproteinized bovine bone (DBB). For this study, 24 rats were used. These animals were randomly allocated 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 type of treatment association applied to the grafted areas: Group 1: DBB-filled capsule that was associated with enamel matrix-derived protein (EMD); Group 2: DBB-filled capsule associated with EMD + LLLT. A Teflon capsule in the form of a dome was installed bilaterally in the ramus of the mandible of each animal, which was filled with DBB that was later fixed in the mandible by means of sutures with 4.0 silk thread that passed through the capsule itself and the perforations performed in the ramus. of the jaw. Microtomographic analyzes were performed to evaluate the volume of mineralized tissue. It was verified that the areas grafted and treated with EMD associated with LLLT presented greater amounts of mineralized tissues than the group where the areas grafted with OBD were treated only with EMD in both experimental periods. Laser therapy associated with EMD promotes greater volume of mineralized tissues than the use of EMD alone in areas grafted with OBD.

Key words: Preclinical study; Low intensity laser; Bone repair; bone substitutes

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 têm 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).

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 a 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 têm sido utilizados de acordo com o comprimento de onda: 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).

Outra forma de se melhorar o reparo ósseo é a utilização de fatores de crescimento (Freitas et al., 2013). As proteínas derivadas da matriz do esmalte têm 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 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).

Áreas enxertadas são consideradas críticas em relação a qualidade do tecido ósseo, principalmente quando são enxertadas com biomateriais com propriedades biológicas de formação óssea osteocondutoras (Zinser et al., 2013). Dessa forma, a associação de terapias que possam melhorar a qualidade da área enxertada poderá acelerar o tratamento de defeitos ósseos de origem congênita ou patológica, e, conseqüentemente, reduzir o tempo de tratamento (Corinaldesi et al., 2013).

OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi de avaliar se a associação da LLLT em baixa intensidade com laser infravermelho e das proteínas derivadas da matriz do esmalte melhoram o reparo de áreas enxertadas com osso bovino desproteínizado.

HIPÓTESE

H0 Não haverá diferença entre a aplicação isolada de proteínas derivadas da matriz do esmalte ou do seu uso associado a irradiação com laser infravermelho sobre o reparo ósseo em áreas enxertadas com osso bovino desproteinizado.

H1 Haverá diferença entre a aplicação isolada de proteínas derivadas da matriz do esmalte ou do seu uso associado a irradiação com laser infravermelho sobre o reparo ósseo em áreas enxertadas com osso bovino desproteinizado.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi submetido e aprovado junto ao Comitê de ética de utilização de animais da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Faculdade de Odontologia de Uberlândia, Brasil (091/18) conforme exposto no Anexo A. Para esse estudo foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus*, variação Wistar) com 3 meses de idade, com peso entre 250e300 g que foram mantidos em um ambiente com temperatura ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade (65-70%), e ciclos de luz (12 horas) controlado. Os animais foram alimentados com ração apropriada e foram oferecidos água e ração *ad libitum*. Esse estudo foi conduzido de acordo com o protocolo ARRIVE para conduta de estudos pré-clínicos.

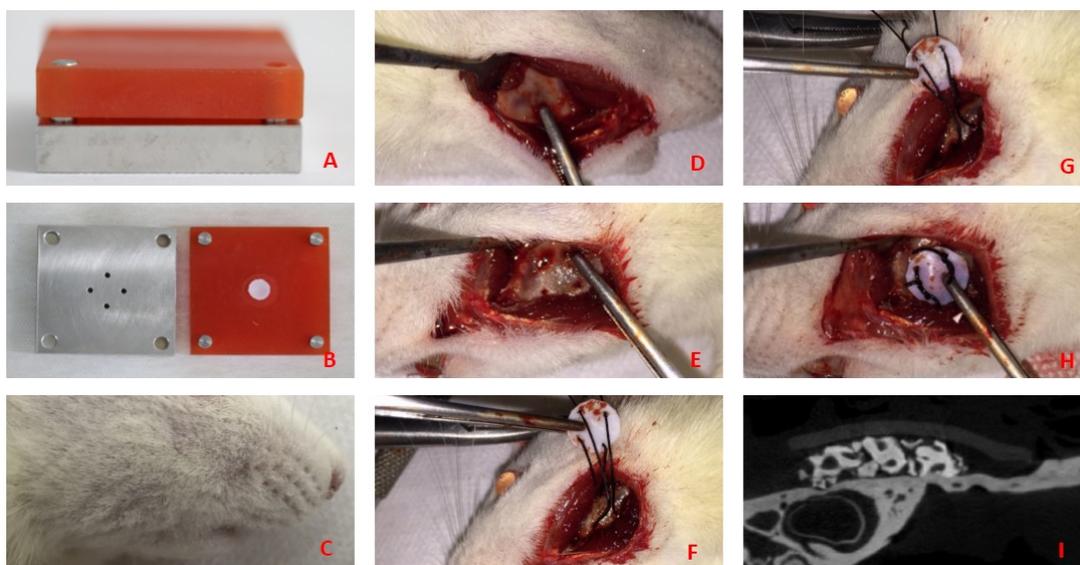
Procedimento Cirúrgico

Após uma semana de aclimação ao ambiente do biotério, os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 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 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 foram descolados 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 desproteinizado (Cerabone, Botiss, Zossen, Alemanha) compactado dentro das cápsulas, que foram posteriormente fixadas na mandíbula por meio de suturas com fio de seda 4.0 que transpassaram as próprias cápsulas e as perfurações executadas no ramo da mandíbula. Os tecidos moles foram reposicionados sobre as cápsulas e suturados 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 sacrificados por meio de sobredosagem anestésica nos períodos de 30 e 90 dias após as cirurgias. A figura 1 expõe o procedimento de confecção dos domos e o procedimento cirúrgico realizado para esse estudo.

Figura 1: A) Dispositivo criado para confecção dos domos utilizados nesse projeto; B) Lâmina de teflon posicionada no dispositivo para confecção dos domos; C) Face lateral da região mandibular do animal; D) Exposição do ramo da mandíbula; E) Perfuração executada para inserção dos domos; F) Início da fixação dos domos; G) Inserção do biomaterial; H) Fixação dos domos; I) Aspecto microtomográfico do domo em posição.



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 e a condição sistêmica do animal a ser avaliado: **Grupo 1:** Cápsula preenchida OBD associada a utilização de EMD; **Grupo 2:** Cápsula preenchida OBD associado a EMD + LLLT.

Irradiação com Laser de Baixa intensidade

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 7 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 28J 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 989,24 J/cm² todo tratamento.

Microtomografia (μCT)

Após os períodos de 30 e 90 dias, os animais foram eutanasiados por meio de sobredosagem anestésica. Os ramos das mandíbulas foram escaneados por meio do aparelho Skyscan (SkyScan, Kontich, Bélgica) com os seguintes parâmetros: Pixel da câmera: 12.45; Potência do tubo de raio x: 65 kVP, intensidade de raio-x: 385 μA , tempo

de integração: 300 ms, filtro: Al-1 mm, e tamanho do voxel: 18 μm^3 . 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.

Análise estatística

Os dados numéricos desse estudo apresentaram distribuição de acordo com a normalidade considerando o teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov. Foi utilizado o teste paramétrico t-não pareado para comparação dos dados entre os grupos e dentro de cada grupo variando-se os períodos experimentais. O software GraphpadPrism 8.4 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para a aplicados dos testes estatísticos. Todos os testes foram aplicados com nível de confiança de 95%.

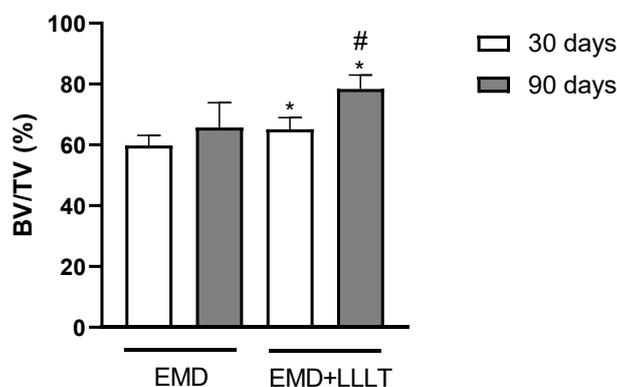
RESULTADOS

Foi verificado que as áreas enxertadas e tratadas com EMD associado a LLLT apresentaram maiores quantidades de tecidos mineralizados do que o grupo onde as áreas enxertadas com OBD foram tratadas apenas com EMD em ambos os períodos experimentais ($p < 0.05$). Também foi verificado maiores valores de BV/TV% ao período de 90 dias em comparação ao período de 30 dias no grupo EMD+LLLT. Os dados de média e desvio padrão do BV/TV (%) em todos os grupos e períodos experimentais estão expostos na tabela e gráfico 1.

Tabela 1: Dados de média e desvio padrão do BV/TV (%) em todos os grupos e períodos experimentais.

Grupo/Período	15 dias	90 dias
EMD	59.81 ± 3.28	65.69 ± 8.14
EMD+LLLT	65.10 ± 3.88	78.35 ± 4.60

Gráfico 1: Dados de média e desvio padrão do BV/TV (%) em todos os grupos e períodos experimentais. * $p < 0.05$ – Valores superiores ao grupo EMD no mesmo período experimental, # $p < 0.05$ – Valores superiores ao período de 15 dias- Teste t-não pareado.



DISCUSSÃO

Foi verificado nesse estudo que a laserterapia com comprimento de onda infravermelho promoveu aumento na quantidade de tecidos mineralizados em áreas enxertadas com OBD associado a utilização de EMD em relação a utilização isolada do EMD. Apesar do EMD apresentar estímulos na formação do tecido ósseo devido ao potencial de diferenciação celular que exerce nas células mesenquimais indiferenciadas para que as mesmas possam se converter em osteoblastos e cementoblastos (Miron et al., 2016), a LLLT em baixa intensidade pode ter potencializado a ação do EMD por agir posteriormente a diferenciação celular, estimulando o metabolismo das células recém-diferenciadas e permitindo que as mesmas tenham produzido tecido ósseo e, conseqüentemente, aumentado o volume dos tecidos mineralizados (Oliveira et al., 2018; Oliveira et al., 2020).

Um fato importante para se considerar ao analisar os resultados desse estudo é que os dados apresentados foram apenas pelo método da microtomografia que não separa o que seria osso neoformado dos remanescentes do tecido ósseo (Oliveira et al., 2020; Oliveira et al., 2021). Dessa forma, apesar da suposição de que esse aumento de tecidos mineralizados promovidos pelo tratamento de associação do EMD com a LLLT tenha ocorrido pela maior formação óssea induzido pelo tratamento e pelo fato de que o OBD apresenta baixa taxa de remodelação (Jensen et al., 2006), essa hipótese necessita ser mais bem explorada por meio de análises histológicas que fornecerão esses dados com maior certeza. Vale salientar que as amostras desse estudo estão em fase de análise histomorfométrica.

Estudos anteriores têm demonstrado que áreas enxertadas com substitutos ósseos osteocondutores apresentam menores taxas de formação de tecido ósseo do que áreas que

são deixadas cicatrizando espontaneamente (Carmagnola et al., 2003; Antunes et al., 2013). Além disso, a osseointegração ocorre de forma mais pobre em áreas enxertadas com substitutos de tecido ósseo osteocondutores (Lima et al., 2022; Quiroz et al., 2022) o que ressalta a importância de se utilizar produtos ou tecnologias que melhorem o perfil de formação óssea nessas áreas. Nesse sentido, a aplicação associada do LLLT com EMD tem potencial de melhorar o processo de osseointegração, porém essa hipótese necessita ser testada futuramente.

A terapia apresentada nesse estudo tem grande potencial para aplicação clínica por ser um método menos invasivo do que a associação com materiais autógenos (ex: enxerto de tecido ósseo ou com concentrados sanguíneos) bem como mais barato em relação a outros fatores de crescimento (ex: BMP). Estudos clínicos futuros serão necessários para melhor compreensão da aplicabilidade desse protocolo e suas vantagens em relação a utilização isolada do OBD em técnicas de enxertia para posterior reabilitação com implantes osseointegrados.

CONCLUSÃO

A laserterapia associada ao EMD promove maior volume de tecidos mineralizados do que a utilização isolada do EMD em áreas enxertadas com OBD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.

- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) de Freitas RM, Susin C, Spin-Neto R, Marcantonio C, Wikesjö UM, Pereira LA, Marcantonio E Jr. Horizontal ridge augmentation of the atrophic anterior maxilla using rhBMP-2/ACS or autogenous bone grafts: a proof-of-concept randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2013 Oct;40(10):968-75.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) Zinser MJ, Randelzhofer P, Kuiper L, Zöller JE, De Lange GL. The predictors of implant failure after maxillary sinus floor augmentation and reconstruction: a retrospective study of 1045 consecutive implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 May;115(5):571-82.
- 25) Corinaldesi G, Piersanti L, Piattelli A, Iezzi G, Pieri F, Marchetti C. Augmentation of the floor of the maxillary sinus with recombinant human bone morphogenetic protein 7: a pilot radiological and histological study in humans. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013 Apr;51(3):247-52.
- 26) 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].
- 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) Oliveira GJPL, Pinotti FE, Aroni MAT, Marcantonio E Jr, Marcantonio RAC. Effect of different low-level intensity laser therapy (LLLT) irradiation protocols on the osseointegration of implants placed in grafted areas. *J Appl Oral Sci*. 2021 Apr 14;29:

e20200647. doi: 10.1590/1678-7757-2020-0647. PMID: 33886940; PMCID: PMC8054649.

- 29) Jensen SS, Brogini N, Hjørting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Jun;17(3):237-43. doi: 10.1111/j.1600-0501.2005.01257. x. PMID: 16672017.
- 30) Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Apr;14(2):137-43. doi: 10.1034/j.1600-0501.2003.140201. x. PMID: 12656871.
- 31) 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 dog's mandible bone defects. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Feb;24(2):135-42. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02385. x. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22168758.
- 32) Lima JR, Soares PBF, Pinotti FE, Marcantonio RAC, Marcantonio-Junior E, de Oliveira GJPL. Comparison of the osseointegration of implants placed in areas grafted with HA/TCP and native bone. *Microsc Res Tech.* 2022 Apr 9. doi: 10.1002/jemt.24126. Epub ahead of print. PMID: 35397154.
- 33) Quiroz VF, Lima JR, Pinotti FE, Marcantonio RAC, Marcantonio-Junior E, de Oliveira GJPL. Comparison of osseointegration in areas grafted with deproteinized bovine bone and native bone. A preclinical study. *Acta Odontol Latinoam.* 2022; 35(1):3-9. doi: <https://doi.org/10.54589/aol.35/1/3>

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS.



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 heterogênico/ 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