



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA-
BIOFOTÔNICA**

LUCIANA TOLEDO COSTA SALVIATTO

**ESTUDO DO EFEITO COMBINADO DOS LASERS Er:YAG E
Nd:YAG NO PREPARO ÓSSEO E NA MODULAÇÃO DO
REPARO PERI-IMPLANTAR EM RATAS COM OSTEOPENIA
INDUZIDA: ESTUDO PRÉ-CLÍNICO RANDOMIZADO E
CONTROLADO**

São Paulo, SP

2025



LUCIANA TOLEDO COSTA SALVIATTO

**ESTUDO DO EFEITO COMBINADO DOS LASERS Er:YAG E
Nd:YAG NO PREPARO ÓSSEO E NA MODULAÇÃO DO
REPARO PERI-IMPLANTAR EM RATAS COM OSTEOPENIA
INDUZIDA: ESTUDO PRÉ-CLÍNICO RANDOMIZADO E
CONTROLADO**

**Tese apresentada à Universidade Nove de Julho,
para obtenção do título de Doutora em Medicina- Biofotônica.
Orientador: Prof. Dr. Alessandro Melo Deana**

São Paulo, SP

2025



FICHA CATALOGRÁFICA

Salviatto, Luciana Toledo Costa.

Estudo do efeito combinado dos lasers Er:YAG e Nd:YAG no preparo ósseo e na modulação do reparo peri-implantar em ratas com osteopenia induzida: estudo pré-clínico randomizado e controlado. / Luciana Toledo Costa Salviatto. 2025.

63 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2025.

Orientador (a): Prof. Dr. Alessandro Melo Deana.



São Paulo, 23 de junho de 2025.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Luciana Toledo Costa Salviatto

Título da Tese: “Estudo do efeito combinado dos lasers Er:YAG e Nd:YAG no preparo ósseo e na modulação do reparo peri-implantar em ratas com osteopenia induzida: estudo pré-clínico randomizado e placebo-controlado”.

Presidente: PROF. DR. ALESSANDRO MELO DEANA 

Membro: PROF^a. DR^a. SANDRA KALIL BUSSADORI 

Membro: PROF^a. DR^a. ILKA TIEMY KATO PRATES 

Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLÉ 

Membro: PROF. DR. JAMIL AWAD SHIBLI 

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, por serem minha base sólida, pelo incentivo constante e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Nove de Julho pela bolsa de doutorado e pela oportunidade, e ao CAPES pelo financiamento da bolsa para a pesquisa.

Aos professores e o Programa e de Mestrado e Doutorado em Medicina-Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde por oferecer sua estrutura e conhecimento para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Diretora do programa, Prof.a. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes, pela dedicação em elevar a qualidade do programa.

À secretaria do programa, em especial a Adriana Carvalho Nascimento pela disponibilidade e atenção prestadas a mim e aos alunos do programa.

Às funcionárias do biotério da Uninove, a veterinária Núria Bustamante de Araujo e a técnica Giuliane pelo cuidado e respeito com os animais, pela impecável organização e limpeza do local e pela pronta disponibilidade em ajudar sempre que eu precisei de orientação.

À Prof.a Dra. Sandra Kalil Bussadori pelas valiosas orientações na banca de qualificação para o desenvolvimento desta tese e pela participação na banca de defesa.

À Prof. Dra. Ilka Tiemy Kato Prates do Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da UFABC pelo cuidado na leitura do texto e nas orientações apresentadas na banca de qualificação, e pela presença na banca de defesa.

Ao Prof. Dr. Jamil Awad Shibli do Programa de Pós-graduação da Universidade de Guarulhos pela participação na banca de defesa.

Aos meus colegas de curso que de diferentes formas me auxiliaram e apoiaram na concretização deste projeto. São eles: Vanessa Dalapria, Cícero Dayves e Erika Mello.

As ex-alunas do programa Patricia Almeida Matos e Marília Lucas Siena por me ensinar e acompanhar as etapas de ovariectomia e análise de fosfatase alcalina.

À SIN® por fornecer os implantes e todos aparato para a instalação destes nos experimentos.

À Fotona®, por ceder o laser para os experimentos, em especial ao Fernando Costa Jr. pela atenção e disponibilidade no curso deste projeto.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Alessandro Melo Deana por me guiar neste caminho do conhecimento e da perseverança. Por não desistir diante das adversidades que surgiram neste percurso e por vibrar comigo a cada conquista alcançada. Seguimos nesta jornada desde o mestrado e levarei esses aprendizados para toda a vida.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Labat pelas horas dedicadas a me ensinar em todas as etapas laboratoriais deste trabalho. Pela paciência explicando nos mínimos detalhes coisas que dentro do seu vasto conhecimento, são extremamente básicas.

Ao meu pai, Prof. Dr. Ivanir Costa por conversar e me ajudar ao invés de descansar após os churrascos de Domingo, mas especialmente por ser a minha principal inspiração.

FINANCIAMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) - programa de bolsas para a formação do pesquisador.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (CAPES) – PROCESSO: 00889834000108

EPÍGRAFE

**"Seja menos curioso sobre as
pessoas e mais curioso sobre
ideias"**

Marie Curie

RESUMO

A osseointegração é um processo dinâmico e multifatorial que pode ser comprometido em condições sistêmicas adversas. Este estudo avaliou os efeitos da associação dos lasers Er:YAG (para preparo do leito ósseo) e Nd:YAG (para fotobiomodulação) no reparo ósseo periimplantar em implantes de titânio instalados em tíbias de ratas Wistar com osteopenia induzida por ovariectomia. Foram utilizados 48 animais divididos em três grupos: controle (C), osteopênico com preparo convencional por fresas (OVX) e osteopênico tratado com a combinação dos lasers (OVX+L). Os animais foram avaliados aos 15 e 45 dias após a instalação dos implantes. As análises incluíram teste biomecânico (*push-in*), dosagem sérica da fosfatase alcalina, quantificação de colágeno total (Picrosirius *Red*) e avaliação morfológica histológica com coloração por hematoxilina-eosina. Os resultados demonstraram menor deposição de colágeno no grupo OVX+L ($p < 0,05$) aos 15 dias, indicando estímulo precoce à formação da matriz óssea. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros biomecânicos e na atividade da fosfatase alcalina entre os grupos. A análise histológica revelou discreta melhora morfológica no grupo OVX+L em comparação ao grupo OVX. Conclui-se que a combinação dos lasers Er:YAG e Nd:YAG favoreceu aspectos iniciais da resposta tecidual periimplantar, sem consolidar benefícios funcionais em termos de resistência mecânica ou atividade bioquímica mensurável nos períodos analisados. Os resultados reforçam a necessidade de novos estudos para elucidar o potencial terapêutico dessa abordagem em condições de baixa densidade óssea.

Palavras-chave: osseointegração; laser Er:YAG; laser Nd:YAG; osteoporose; implantes dentários; fotobiomodulação; modelo animal.

ABSTRACT

Osseointegration is a dynamic and multifactorial process that can be compromised under adverse systemic conditions. This study evaluated the effects of the combined use of Er:YAG laser (for osteotomy) and Nd:YAG laser (for photobiomodulation) on the osseointegration of titanium implants placed in the tibiae of ovariectomized Wistar rats with induced osteopenia. A total of 48 animals were divided into three groups: healthy control (C), osteopenic with conventional drilling (OVX), and osteopenic treated with the laser combination (OVX+L). Animals were evaluated at 15 and 45 days after implant placement. Analyses included biomechanical testing (push-in), serum alkaline phosphatase (ALP) quantification, total collagen assessment using Picrosirius *Red* staining, and histological morphological evaluation with hematoxylin-eosin staining. Results showed a significantly lower collagen deposition in the OVX+L group ($p < 0.05$) at 15 days, suggesting an early stimulus for bone matrix formation. However, no statistically significant differences were observed in biomechanical performance or ALP activity among the groups. Histological analysis revealed slight morphological improvement in the OVX+L group compared to the OVX group. It is concluded that the combined use of Er:YAG and Nd:YAG lasers promoted early peri-implant tissue responses, without leading to functional benefits in terms of mechanical strength or measurable biochemical activity within the evaluated periods. These findings highlight the need for further studies to clarify the therapeutic potential of this approach under conditions of low bone density.

Keywords: osseointegration; Er:YAG laser; Nd:YAG laser; osteoporosis; dental implants; photobiomodulation; animal model.

DESTAQUES

- 1 Inovação metodológica:** A tese investigou, pela primeira vez em um modelo animal com osteopenia induzida, o uso combinado dos lasers Er:YAG (para preparo do leito ósseo) e Nd:YAG (para fotobiomodulação), propondo uma alternativa promissora para melhorar o reparo ósseo periimplantar em pacientes com baixa densidade óssea.
- 2 Parâmetros amplos de avaliação:** Foram avaliados indicadores biomecânicos (push-in), bioquímicos (FA sérica), histológicos (HE) e de colágeno (Picrosirius Red) .
- 3 Resultados promissores na fase inicial:** O grupo OVX+L apresentou menor quantidade inicial de colágeno ($p<0,05$) aos 15 dias, sugerindo estímulo inicial positivo na regeneração óssea.
- 4 Ausência de ganho funcional significativo:** Apesar da melhora histológica e menor quantidade de colágeno, não houve diferença estatisticamente significativa nos testes biomecânicos e bioquímicos entre os grupos, indicando limitação funcional dos efeitos.
- 5 Contribuição ao avanço do conhecimento em biofotônica aplicada à saúde:** O trabalho oferece evidência experimental nova sobre o uso combinado de lasers na osseointegração em condição osteopênica.

HIGHLIGHTS

- 1** Methodological innovation: This thesis investigated, for the first time in an animal model with induced osteopenia, the combined use of Er:YAG lasers (for bone bed preparation) and Nd:YAG lasers (for photobiomodulation), proposing a promising alternative for improving peri-implant bone repair in patients with low bone density.
- 2** Broad evaluation parameters: Biomechanical (push-in), biochemical (serum ALP), histological (HE), and collagen (Picrosirius Red) indicators were evaluated.
- 3** Promising results in the initial phase: The OVX+L group showed a lower initial collagen content ($p<0.05$) at 15 days, suggesting a positive initial stimulus for bone regeneration.
- 4** Absence of significant functional gain: Despite the histological improvement and lower collagen content, there was no statistically significant difference in biomechanical and biochemical tests between the groups, indicating functional limitations of the effects.
- 5** Contribution to the advancement of knowledge in biophotonics applied to health: The work offers new experimental evidence on the combined use of lasers in osseointegration in osteopenic conditions.

RESUMO PARA LEIGOS

Os implantes dentários precisam se fixar firmemente no osso, um processo chamado ósseo integração, que pode ser prejudicado em pessoas com osteopenia, uma condição de enfraquecimento ósseo. Este estudo testou se o uso combinado de dois tipos de lasers (Er:YAG e Nd:YAG) poderia ajudar na fixação de implantes em um modelo experimental com osteopenia. Os testes foram feitos em três grupos: um grupo saudável com perfuração com uso de brocas, um grupo com osteopenia (induzida pela retirada dos ovários, simulando a osteopenia pós-menopausa) com perfuração com uso de brocas e um grupo com osteopenia tratado com lasers. O laser Er:YAG foi usado para abrir espaço no osso para o implante, e o laser Nd:YAG para estimular o reparo do osso. Após 15 dias, os resultados mostraram que os implantes estavam igualmente firmes em todos os grupos, mas os animais tratados com laser apresentaram sinais de maior atividade das células responsáveis pela formação óssea. No entanto, ao observar o osso no microscópio, não foram vistas grandes diferenças estruturais, embora o grupo tratado com laser apresentasse uma leve melhora na organização do osso. Depois de 45 dias, os melhores resultados foram do grupo saudável. Já os grupos com osteopenia, com ou sem laser, tiveram uma fixação mais fraca dos implantes. Apesar disso, os lasers parecem ajudar nos estágios iniciais do processo de cicatrização do osso.

LISTA DE SIGLAS

AMPK - proteína quinase ativada por monofosfato de denosina

°C – graus celsius

C – controle

DMO – densidade mineral óssea

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FA – fosfatase alcalina

g – gramas

HE – hematoxilina e eosina

Hz - Hertz

IBSP – sialoproteína óssea

J - joules

Kg - kilogramas

Laser Er:YAG - Laser de Érbio: ítrio-alumínio-granada

Laser Nd:YAG - Laser de Neodímio-ítrio-alumínio-granada

FBM - fotobiomodulação

mg – microgramas

min - minutos

mJ - milijoules

mL – mililitros

mm - milímetros

MRONJ - osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos

nm - nanômetros

OCN – osteocalcina

OVX – ovariectomia

OVX + L – ovariectomia + laser

PBS - solução salina tamponada

PR – Paraná

RUNX2 – fator de transcrição RUNX2

SIRT - sirtuínas

U/L – unidades por litro

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

λ – lâmbda – comprimento de onda

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Delineamento experimental. (*) refere-se a eutanásia de metade dos animais após 15 dias da cirurgia de instalação dos implantes. (*) refere-se a eutanásia da outra metade após 45 dias da instalação dos implantes	17
Figura 2 Linha temporal dos procedimentos. OVX: após 74 dias nos grupos OVX e OVX + LASER os implantes foram instalados. Eutanásia: 15 e 45 dias após as cirurgias de instalação dos implantes	17
Figura 3 Figuras representativas do procedimento de ovariectomia. (A) anestesia intraperitoneal (B) Incisão de 5 cm na linha peritoneal (C) Localização e remoção dos ovários (D) suturas por camadas	19
Figura 4 Implante SIN® ao lado da fresa utilizada nas cirurgias convencionais.....	21
Figura 5 A) perfuração com a fresa SIN® 1.2mm calibrada no comprimento do implante (2,7mm) 6B) instalação dom implante com chave manual hexagonal 0,9mm SIN® 6C) implante instalado a nível ósseo	22
Figura 6 Desenho do implante de titânio SIN®	22
Figura 7 Sequência do procedimento cirúrgico de instalação dos implantes nas tíbias dos animais dos grupos C e OVX.....	23
Figura 8 Tira de aço perfurada com a fresa 1.2mm SIN® utilizada para marcação do diâmetro da perfuração com o laser de Er:YAG.....	24
Figura 9 a) início da ablação óssea com laser Er:YAG no ponto de instalação do implante, b) aspecto final do sítio de instalação do implante c) instalação de forma manual com chave hexagonal 0.9 SIN®, d) Fotobiomodulação com laser de Nd:YAG.....	26
Figura 10 sequência dos procedimentos cirúrgicos realizados com os lasers de Er:YAG e Nd:YAG para perfuração, FBM e instalação dos implantes no grupo OVX+L.....	28
Figura 11 Paquímetro eletrônico digital da marca Powerfix® Prof+ ao lado das amostras descongeladas	30
Figura 12 Gráfico de dispersão do cp8 do grupo controle no tempo de eutanásia de 15 dias.....	31
Figura 13 foto ilustrativa do ensaio biomecânico (teste push-in) mostrando a haste carregando o implante verticalmente para baixo.....	31

Figura 14 Sequência de imagens representativas das fotomicrografias de uma lâmina corada com Picrossirius <i>red</i> com aumento de 400x para quantificação do colágeno em Pixels. A Fig 14 a) representa os espaços vazios marcados em vermelho, b) representa o colágeno imaturo marcado em amarelo, c) representa o colágeno mineralizado e d) a contagem dos Pixels.	34
Figura 15 Lamínulas de todas as ratas que foram ovariectomizadas.	36
Figura 16 a) Fotomicrografia (100x) do esfregaço vaginal mostrando um grande número de neutrófilos dispersos b) foto ampliada de um neutrófilo	37
Figura 17 Gráfico de barras dos dados da medida Stress (MPa) aos 15 dias. As barras de erro representam os erros padrão	38
Figura 18 Gráfico de barras dos dados da medida Stress (MPa) aos 45 dias. As barras de erro representam os erros padrão	38
Figura 19 Gráfico de barras dos dados da medida <i>Strain</i> aos 15 dias. As barras de erro representam os erros padrão	39
Figura 20 Gráfico de barras dos dados da medida <i>Strain</i> aos 45 dias. As barras de erro representam os erros padrão	40
Figura 21 Gráfico com os níveis séricos de fosfatase alcalina (u/L) por grupo experimental nos tempos de avaliação de 15 dias (a) e 45 dias (b) após a instalação dos implantes de titânio. As barras de erro representam os erros padrão	41
Figura 22 Quadro comparativo das fotomicrografias obtidas no aumento de 100x. a, b) CTL (grupo controle) 15 e 45 d, c, d) OVX (grupo ovariectomia com cirurgia convencional) 15 e 45 d, e, f) OVX+L (grupo ovariectomia e cirurgia com lasers) 15 e 45 d. C (cortical), M (medular) e T (tecido ósseo de transição)	42
Figura 23: Gráfico de médias da porcentagem de colágeno para os grupos estudados. As barras de erro representam os erros padrão. Fonte: autora	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Parâmetros utilizados para o preparo e limpeza do leito ósseo e para a fotobiomodulação na instalação dos implantes no grupo OVX+L.....	26
--	----

SUMÁRIO

1.	CONTEXTUALIZAÇÃO	1
1.1.	Relevância inovadora da pesquisa	3
1.2.	Relação estrogênio x menopausa	3
1.3.	Remodelamento e reparo ósseo	4
1.4.	Osseointegração	5
1.5.	Laser de Érbio em tecidos ósseos	6
1.6.	Laser de Neodímio	8
1.7.	Estado da arte	10
1.8.	Justificativa	12
1.9.	Hipóteses	13
2.	OBJETIVOS	14
2.1.	Objetivo geral	14
2.2.	Objetivos Específicos	14
3.	METODOLOGIA	15
3.1.	Ética	15
3.2.	Análise estatística	15
3.3.	Inteligência artificial	15
3.4.	Repositório de dados	15
3.5.	Tamanho amostral	15
3.6.	Grupos experimentais	16
3.7.	Ovariectomia (OVX)	18
3.8.	Coleta e exames para confirmação da efetividade da OVX	19
3.9.	Cirurgias para instalação dos implantes	20
3.9.1.	Cirurgia convencional no grupo C e OVX	20
3.9.2.	Procedimento cirúrgico a laser	24
3.10.	Eutanásia e coleta das amostras	28

3.11.	Análise biomecânica (teste push-in)	29
3.12.	Análise bioquímica – atividade sérica da fosfatase alcalina.....	32
3.13.	Análise morfológica - histologia	33
3.14.	Análise de Colágeno total	33
4.	RESULTADOS.....	36
4.1.	Confirmação da efetividade da OVX.....	36
4.2.	Análise da Stress (MPa).....	37
4.3.	Análise da Strain	39
4.4.	Análise Bioquímica – Atividade sérica da FA.....	40
4.5.	Análise morfológica – histologia	41
4.6.	Análise Colágeno Total.....	43
5.	DISCUSSÃO.....	46
5.1.	Limitações da pesquisa	50
6.	CONCLUSÃO	51
7.	TRABALHOS FUTUROS.....	52
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO A - Certificado de aprovação do projeto de pesquisa emitido pelo Ceua da Uninove		60
ANEXO B - Certificado de aprovação de emenda do projeto de pesquisa emitido pelo Ceua da Uninove		61
ANEXO C – Manual do kit de fosfatase alcalina da Labtest®.....		62
ANEXO D – QUESTIONÁRIO ARRIVE		63

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Os ossos desempenham funções mecânicas fundamentais, como a sustentação da musculatura para locomoção e a proteção de órgãos vitais, como coração, cérebro e pulmões. Além disso, atuam no armazenamento e liberação de cálcio (Ca^{++}), contribuindo para a regulação da calcemia. Estruturalmente, o tecido ósseo é composto pelo osso cortical, mais externo e denso, e pelo osso esponjoso, internamente poroso e interconectado, onde se aloja a medula óssea. Este tecido é metabolicamente dinâmico, passando por remodelação contínua; o desequilíbrio desse processo pode levar a patologias, como a osteoporose. A osteoporose caracteriza-se por “uma perda de tecido ósseo e alterações na organização do tecido ósseo, e decorre de um desequilíbrio na remodelação dos ossos, com predomínio da reabsorção sobre a neoformação de tecido ósseo”¹. A Organização Mundial de Saúde define a osteoporose como uma perda de massa óssea e deterioração da microarquitetura, trazendo fragilidade óssea e ocasionado o aumento da ocorrência de fraturas².

O aumento da expectativa de vida da população mundial tem sido acompanhado por desafios significativos no campo da saúde. Um exemplo importante é a prevalência da osteoporose³. A prevalência mundial da osteoporose é muito elevada afetando cerca de 18,3% da população, mostrando-se mais significativa na África e na Europa e maior nas mulheres pós menopausa em comparação com homens ⁴. O estudo epidemiológico BRAZOS, com 2.420 brasileiros acima de 40 anos, revelou que 15,1% das mulheres e 12,8% dos homens tiveram fraturas de baixo impacto, sendo os principais locais o antebraço distal (30%), quadril (12%), úmero (8%), costelas (6%) e coluna (4%). Não houve diferença significativa entre gênero e classe social, mas mulheres em áreas metropolitanas apresentaram maior incidência de fraturas do que em áreas rurais. Muitos participantes com fratura osteoporótica prévia desconheciam sua condição de fragilidade óssea associada à osteoporose. Os autores ressaltaram que há grandes lacunas nos dados epidemiológicos sobre a prevalência de osteoporose no Brasil, causadas por limitações nos métodos de classificação de fraturas, falta de informações sobre comorbidades e pela própria natureza silenciosa da osteoporose. A ausência de sintomas claros leva à subutilização de exames e tratamentos preventivos, resultando em

diagnósticos tardios. Essas dificuldades metodológicas e diagnósticas dificultam a avaliação precisa da incidência e prevalência da osteoporose, subestimando seu impacto na saúde pública e nos custos associados ao tratamento de fraturas⁵. A detecção precoce da perda de densidade mineral óssea (DMO) permite o início do tratamento para estimular a formação óssea ou inibir a reabsorção, evitando progressão da doença, que pode resultar em perda significativa do osso cortical (até 35%) e esponjoso (até 50%)^{6,7}.

No contexto da osseointegração de implantes dentários, a osteoporose apresenta desafios específicos. A perda de massa óssea, especialmente em densidade óssea de grau 4, pode levar a uma falha na estabilidade e integração do implante devido ao aumento do espaço trabecular e menor qualidade óssea⁸. Embora alguns estudos sugiram que a osteoporose afete diretamente a osseointegração, há divergências sobre a real extensão desse impacto, com a maioria apontando que o acompanhamento clínico adequado pode contribuir para o sucesso do tratamento de reabilitação⁹.

O laser de Er:YAG (Granada de Ítrio e Alumínio dopada com Érbio) operando no comprimento de onda $\lambda = 2940$ nm, é utilizado para a realização de uma osteotomia sem contato com o tecido, reduzindo desta forma o trauma e o risco de contaminação, realizando uma ablação limpa e sem danos térmicos. Isto se deve porque a radiação com este comprimento de onda é bem absorvida pela água e pela hidroxiapatita^{10,11}. Adicionalmente, a formação de uma superfície óssea micro rugosa, altamente hidrofílica, contribui para a melhor retenção da malha de fibrina e para a adesão celular, otimizando as fases iniciais do reparo tecidual e da osseointegração o que resulta na popularização do uso do laser de Er:YAG ablação óssea^{12,13,14}.

Concomitantemente, o laser de Nd:YAG (Granada de Ítrio e Alumínio dopada com Neodímio) com comprimento de onda de $\lambda = 1064$ nm, tem potencial utilização para fotobiomodulação, acelerando a cicatrização de feridas e apresentando efeitos analgésicos e anti-inflamatórios^{15,16}. Apesar deste laser ser amplamente reconhecido por sua utilização em cirurgias ablativas de tecidos moles bem como na descontaminação peri-implantar, seus efeitos terapêuticos ainda têm sido investigados e não são bem compreendidos pela literatura^{17,18}.

Diante dos desafios impostos pela osteoporose à osseointegração, torna-se relevante investigar intervenções que favoreçam a estabilidade e o reparo

ósseo ao redor de implantes. Nesse sentido, o presente estudo busca avaliar, em modelo animal de osteoporose, os efeitos do preparo do leito ósseo com laser Er:YAG associado à fotobiomodulação com laser Nd:YAG, visando contribuir com evidências para estratégias terapêuticas mais eficazes em situações de baixa densidade óssea.

1.1. Relevância inovadora da pesquisa

A elevada prevalência da osteoporose e seu efeito silencioso sobre a qualidade do tecido ósseo impõem desafios clínicos significativos, especialmente em procedimentos que dependem da estabilidade óssea, como a instalação de implantes dentários.

A combinação das propriedades ablativas do Er:YAG com os efeitos bioestimuladores do Nd:YAG pode representar uma alternativa inovadora para otimizar a instalação de implantes em pacientes com osteoporose.

A escassez de evidências experimentais sobre a aplicação combinada desses dois lasers em condições de osso comprometido justifica a realização de estudos controlados em modelos animais, como o utilizado neste projeto.

Os achados deste estudo também podem servir de base para a adaptação de protocolos clínicos com tecnologias de menor custo, como o uso de lasers de diodo para fotobiomodulação e instrumentos piezelétricos para osteotomia, viabilizando a aplicação dos benefícios observados em contextos clínicos com recursos limitados.

1.2. Relação estrógeno x menopausa

O estrógeno, principalmente o 17β -estradiol, é essencial para a manutenção DMO em mulheres. Durante a menopausa, a redução na produção de estrógeno aumenta a atividade dos osteoclastos, levando a uma rápida perda de massa óssea nos primeiros anos e elevando o risco de osteoporose e fraturas, especialmente no quadril e coluna. Essa deficiência também diminui a eficiência da absorção de cálcio ao reduzir os receptores de vitamina D no intestino, o que agrava a redução da DMO. Além disso, os níveis de colesterol LDL aumentam, elevando o risco cardiovascular, e há possíveis impactos negativos na cognição e estabilidade postural¹⁹.

1.3. Remodelamento e reparo ósseo

A matriz óssea é composta por dois componentes principais: um orgânico e outro inorgânico. Aproximadamente 95% da fração orgânica é constituída por fibras colágenas, predominantemente colágeno do tipo I. Os 5% restantes incluem outros tipos de colágeno, além de glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas, que desempenham papéis fundamentais na organização estrutural e funcional do tecido ósseo¹.

Para entender a fisiopatologia da osteoporose, é essencial compreender o processo fisiológico do remodelamento ósseo. Esse processo dinâmico envolve a ação coordenada de osteoclastos, que reabsorvem o osso, e osteoblastos, que formam novo tecido ósseo, regulando assim a densidade e a integridade óssea de acordo com as demandas mecânicas e as necessidades de cálcio e fósforo no organismo²⁰.

O mecanismo de remodelamento ósseo é regulado por várias vias de sinalização, como o sistema RANK/RANKL/OPG, que controla diretamente a atividade dos osteoclastos, e pela sinalização Wnt/ β -catenina, que influencia a formação óssea. Essas vias são cruciais para manter o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea ao longo da vida ²¹.

A atividade do tecido ósseo é caracterizada pelos processos de formação e reabsorção e pode ser avaliada por meio de marcadores bioquímicos. Dentre esses marcadores, a Fosfatase Alcalina (FA) tem sido amplamente utilizada na prática clínica ao longo das últimas décadas. A etapa de síntese da matriz colágena ocorre simultaneamente ao aumento na produção de fosfatase alcalina, enquanto o processo de mineralização está associado a uma elevação na produção de osteocalcina²².

A FA também é amplamente reconhecida como um marcador fenotípico dos osteoblastos e um indicador relevante da formação óssea. No contexto do tecido ósseo, sua função está possivelmente relacionada à deposição de fósforo de cálcio, sendo observada em níveis elevados em diversas condições patológicas. A quantificação da FA no organismo pode ser realizada por meio de exames sanguíneos, auxiliando no diagnóstico e monitoramento de distúrbios ósseos ²³.

1.4. Osseointegração

A restauração da dentição em pacientes completamente ou parcialmente edêntulos, por meio da utilização de implantes endoósseos de titânio, fundamenta-se predominantemente no princípio biológico conhecido como osseointegração. A osseointegração representa a etapa final da cicatrização óssea ao redor dos implantes e acontece quando há a conexão direta de osso vivo e organizado com a superfície do implante dentário que receberá carga²⁴.

Estudos em tíbias de ratos, através da análise histológica e histomorfométrica, revelaram a presença inicial de osso imaturo não osseointegrado aos 6 dias, seguido por um aumento no volume ósseo entre 7 e 10 dias. Aos 12-13 dias, iniciou-se a formação de osso lamelar na superfície do implante, substituindo completamente o osso imaturo até o dia 14, com crescimento ósseo adicional após 60 dias. Estes estudos permitiram quantificar as fases da osseointegração, incluindo a formação do coágulo sanguíneo, a substituição por osso neoformado e, finalmente, a formação de osso lamelar^{25,26}.

Um dos requisitos para garantir o sucesso da osseointegração é a técnica empregada para a perfuração do osso que deve ser realizada em baixa velocidade, o que minimiza os danos aos tecidos e previne a ocorrência de necrose²⁷. A osseointegração bem-sucedida reside na obtenção de um contato direto entre o osso e o implante, eliminando qualquer interposição de tecido conjuntivo. Este objetivo pode ser comprometido em virtude da exposição do tecido ósseo a elevadas temperaturas durante os procedimentos cirúrgicos de perfuração convencional, uma vez que se estabeleceu um limite crítico para danos aos osteócitos em torno de 47°C, e devido à formação de uma camada de esfregaço nas paredes do canal²⁸.

Para mitigar o risco de aumento de temperatura, recomenda-se a adoção da técnica de perfuração intermitente utilizando brocas afiadas e assegurando uma irrigação adequada. Independentemente da técnica empregada, é reconhecido que a preparação do leito cirúrgico deve ser conduzida com cuidado para minimizar o trauma mecânico e térmico nos tecidos. Isso é fundamental, visto que a qualidade do preparo do leito cirúrgico influencia a indução e o subsequente desenvolvimento do processo de cicatrização óssea. Assim, aprimorar as técnicas de osteotomia e corte ósseo na prática de cirurgia oral e medicina cirúrgica desempenha um papel determinante na busca por

alternativas mais eficazes às abordagens tradicionais de preparação do local de inserção de implantes²⁸.

A resistência óssea é um parâmetro crucial na área de implantodontia, levando à crescente preocupação sobre o impacto da osteoporose no sucesso do tratamento com implantes. Diversas investigações têm demonstrado que a osteoporose pode atuar como um fator de risco significativo, influenciando negativamente os resultados dos implantes dentários²⁹.

A presença de osteoporose pode proporcionar uma osseointegração prejudicada devido a uma discrepância na atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Subsequentemente, pode ocorrer uma demora no reparo após a instalação do implante dentário, o que, por sua vez, se traduz em um prolongamento do período de reabilitação e uma redução na qualidade de vida dos pacientes que apresentam perda parcial ou total de seus dentes³⁰.

A literatura permanece controversa ao fato de que pacientes com osteoporose são candidatos a uma menor taxa de osseointegração ou a uma maior perda peri-implantar com o passar dos anos, e os estudos clínicos apresentam resultados contrários aonde um consenso literário ainda não foi alcançado^{29, 31}.

1.5. Laser de Érbio em tecidos ósseos

O laser de Er:YAG é um laser de estado sólido que emite radiação com comprimento de onda de $\lambda = 2940$ nm, coincidente com um pico de alta absorção da água. Essa característica torna-o altamente eficaz na interação com tecidos biológicos ricos em água, incluindo tecidos moles e duros, como o tecido ósseo. Nos tecidos mineralizados, o mecanismo de ação do Er:YAG ocorre predominantemente por ablação explosiva mediada pela água, resultante de efeitos fotomecânicos e fototérmicos, promovendo a remoção controlada do tecido sem induzir carbonização, microfraturas ou rachaduras na superfície óssea. A elevada absorção na água, por sua vez, restringe a dissipação de calor para os tecidos adjacentes, reduzindo significativamente os efeitos térmicos colaterais durante a irradiação^{13,14}.

Sua radiação de 2.940 nm e a alta afinidade pela água (coeficiente de absorção alto), resulta em uma profundidade de penetração superficial no osso,

variando entre 0,8 μm e 8 μm . Isto limita a ação do feixe exclusivamente às camadas mais externas do tecido, minimizando o risco de danos térmicos ou estruturais aos tecidos adjacentes. Essas propriedades conferem ao laser Er:YAG precisão e segurança em procedimentos cirúrgicos, como por exemplo no preparo de leitos ósseos para implantes^{32, 33}.

Estudos prévios demonstram que a irradiação com laser Er:YAG favorece a ativação osteoblástica, promovendo uma aceleração nos processos de neoformação óssea. Além disso, esse tipo de irradiação contribui para o aumento da taxa de retenção de fibrina e da estabilidade do coágulo sanguíneo, fatores fundamentais para a fase inicial do reparo ósseo. A superfície óssea resultante do processo de ablação apresenta características físico-químicas aprimoradas, como maior hidrofiliabilidade, que favorecem a adesão celular e o recrutamento de células envolvidas na cicatrização. Esses efeitos são atribuídos, em grande parte, à eficiente remoção de resíduos biológicos e contaminantes proporcionada pela ablação fotomecânica, que gera uma superfície limpa, e biologicamente mais receptiva, otimizando os eventos celulares envolvidos na osseointegração precoce.^{34, 35, 36, 37, 38} A aplicação da irradiação a laser Er:YAG nos tecidos ósseos circundantes a implantes, mediante o efeito foto térmico, mostrou ser uma abordagem relativamente segura, demonstrando, além dos benefícios aludidos anteriormente, possíveis efeitos bactericidas³⁹.

Estudos experimentais que compararam o preparo ósseo com laser Er:YAG e brocas rotatórias demonstram vantagens estruturais associadas ao uso do laser. Kanazirski *et al.* (2023)³⁸ ao analisarem osteotomias em mandíbulas suínas, observaram que as fresas geraram margens irregulares, microfraturas, obstrução dos canais nutricionais e acúmulo de *smear layer*. Em contraste, o uso complementar do Er:YAG resultou em bordas lineares, canais expostos e ausência de carbonização, sugerindo uma interface óssea mais favorável à osseointegração.

Ohsugi *et al.* (2019)⁴⁰ realizaram osteotomias calvarianas em ratos Wistar com avaliação histológica, micro-CT, SEM, qRT-PCR e imunohistoquímica, e constataram que o Er:YAG preservou melhor a arquitetura óssea, reduziu danos térmicos e induziu maior atividade osteogênica, com aumento na expressão de osteocalcina e na taxa de reparo ósseo. Esses achados reforçam que o laser promove um microambiente mais propício à regeneração óssea em comparação

à fresagem convencional. Outro estudo corrobora essa evidência, demonstrando que o uso de lasers para ablação pode reduzir o risco de necrose térmica e promover um ambiente mais adequado para a recuperação óssea em comparação com métodos convencionais de osteotomia⁴¹.

Além dos efeitos morfológicos já demonstrados em osteotomias realizadas com laser Er:YAG, estudos mais recentes investigaram sua aplicação direta no preparo de leitos ósseos para instalação de implantes.

Em um modelo experimental com mini porcos, Semez *et al.* (2021)⁵⁷ avaliaram o uso de um sistema de scanner a laser Er:YAG, observando que a cavidade obtida apresentava margens precisas, ausência de sobreaquecimento e integridade tecidual preservada. Os implantes instalados nesses sítios apresentaram valores de torque de inserção e estabilidade inicial compatíveis ou superiores aos obtidos com fresagem convencional.

Complementarmente, Stübinger *et al.* (2010)⁶⁷ compararam diretamente o desempenho do laser Er:YAG, piezoelétrico e brocas rotatórias no preparo de leitos implantáveis em ovelhas. As análises histológicas e os testes de torque de remoção ao longo de 4, 6 e 8 semanas indicaram que todas as técnicas foram eficazes quanto à osseointegração, embora o laser e o piezo tenham demonstrado maior preservação da microarquitetura óssea e menor formação de fissuras térmicas. Consolidando essa evidência, a revisão sistemática conduzida por Tretto *et al.*⁴² (2019) concluiu que, embora o preparo com Er:YAG promova uma superfície óssea mais regular e com menor trauma inicial, os desfechos em longo prazo são comparáveis aos obtidos com fresagem rotatória, indicando que ambas as abordagens são eficazes na promoção da osseointegração quando bem indicadas.

1.6. Laser de Neodímio

O laser Nd:YAG emitindo com comprimento de onda central de $\lambda = 1064\text{nm}$ atua principalmente em tecidos com cromóforos como a hemoglobina, e nas cirurgias de implante, auxilia na coagulação atuando na redução da inflamação de tecidos moles e reduzindo o tempo cirúrgico^{43, 44}. Os efeitos fototérmicos e fotoquímicos do laser Nd:YAG podem rapidamente exibir a função de eliminar micro-organismos localizados mais profundamente após ser

absorvido pelos tecidos, e ao ser utilizado em baixa intensidade, pode promover a proliferação e a maturação de osteoblastos acelerando a formação e o metabolismo ósseo^{45, 46, 47}.

A fotobiomodulação (FBM) tem sido amplamente estudada por seus efeitos benéficos na cicatrização de feridas, incluindo propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e cicatrizantes⁴⁸. No entanto, a aplicação específica do laser Nd:YAG nesse contexto é menos comum, possivelmente devido aos altos custos envolvidos na aquisição de equipamentos com esta tecnologia. Embora tradicionalmente fabricados para a obtenção de feixes de alta potência, este comprimento de onda tem demonstrado potencial significativo para aplicações em FBM, especialmente em tecidos profundos. Sua capacidade de penetração tecidual — variando entre 0,5 a 4 mm — deve-se à baixa absorção pela água o que o diferencia dos lasers de diodo convencionalmente utilizados para este fim⁴⁹.

Estudos relatam efeitos bioestimuladores relevantes do Nd:YAG emitindo em $\lambda = 1064$ nm em células do microambiente oral, como osteoblastos, além de benefícios clínicos como a melhora funcional em quadros musculoesqueléticos⁵⁰, osteonecrose dos maxilares¹⁸, pericoronarite⁵¹ e na cicatrização de feridas orais⁵². Essas propriedades foto físicas e os resultados terapêuticos relatados reforçam a indicação do laser nesta região do espectro para aplicações biomodulatórias, mesmo em contextos em que sua utilização ainda é menos frequente, justificando seu uso em protocolos experimentais voltados à reparação tecidual e modulação da resposta inflamatória.

A irradiação com esse comprimento de onda é capaz de modular vias intracelulares associadas à resposta inflamatória e ao estresse oxidativo, especialmente por meio da ativação da via AMPK-SIRT3, promovendo efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes em fibroblastos gengivais humanos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). Essa modulação envolveu a redução de mediadores inflamatórios como IL-6, TNF- α , COX2 e iNOS, com consequente redução de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo os efeitos revertidos pela inibição da AMPK, o que confirma seu papel central na cascata bioquímica ativada⁵³.

Em estudos experimentais com modelos unicelulares eucarióticos (*Paramecium primaurelia*), a aplicação do Nd:YAG com parâmetros de irradiação

apropriados resultou em aumento da síntese endógena de ATP, elevação do consumo de oxigênio e estímulo à proliferação celular, enquanto doses mais elevadas induziram efeitos deletérios e aumento de proteínas de estresse celular⁵⁴. Além disso, revisões sistemáticas demonstram que a FBM com diferentes comprimentos de onda, incluindo o Nd:YAG, está associada à ativação mitocondrial e à diferenciação osteoblástica em função da modulação dose-dependente das ROS, que atuam como segundos mensageiros em processos regenerativos⁵⁵. Esses dados indicam que o uso do laser Nd:YAG em parâmetros específicos de baixa potência pode representar uma estratégia promissora para a modulação da inflamação, indução da regeneração tecidual e aplicação clínica na reparação óssea peri-implantar.

1.7. Estado da arte

Dumic *et al.*⁵⁶ (2020), avaliaram o uso de lasers Er:YAG e Nd:YAG em um protocolo pós-extração para preservação do alvéolo dentário, comparando com procedimento convencional de extração. Foram incluídas 53 extrações simples, randomizadas entre grupo laser e controle. No grupo laser, os dispositivos foram utilizados para degranulação, desinfecção, desepitelização, estabilização do coágulo e fotobiomodulação. A densidade óssea foi medida por CBCT no dia 1 e após 4 meses. O grupo laser apresentou um aumento significativamente maior na densidade óssea ($p < 0.001$) e ausência de dor, sangramento ou edema, ao contrário do grupo controle. A análise estatística indicou eficácia do laser independentemente de variáveis como idade e condição periodontal, com benefício adicional em pacientes idosos e com periodontite crônica. Concluiu-se que o protocolo com laser é seguro, promove maior regeneração óssea e reduz complicações, favorecendo reabilitação precoce e melhor prognóstico implantológico.

Semez *et al.*⁵⁷ (2021), realizaram um estudo in vivo com minis porcos para avaliar a viabilidade do uso do laser Er:YAG (Fotona Fidelis Plus II®), acoplado a um sistema de ultrassom para padronização da perfuração, na preparação do leito ósseo para implantes, em comparação ao método convencional com brocas rotatórias. Após extrações dentárias e dois meses de cicatrização, quatro implantes foram instalados por animal, sendo metade dos sítios preparados por

brocas e a outra metade por laser. A análise histológica, em diferentes períodos de cicatrização (45, 60, 90 e 120 dias), demonstrou maior formação de osso lamelar e menor necrose no grupo tratado com laser. A estabilidade primária, medida por torque de inserção e frequência de ressonância, não diferiu entre os grupos. Os autores concluíram que o preparo a laser apresenta vantagens histológicas e demonstrou viabilidade *in vivo*, com potencial aplicação em protocolos de carga imediata, embora reforcem a necessidade de padronização e validação clínica.

Zhao *et al*⁵⁸ (2022), investigaram o uso combinado dos lasers Er:YAG e Nd:YAG como adjuvantes na instalação de implantes em fêmures de coelhos, avaliando seus efeitos na inflamação e no reparo ósseo. Os animais foram divididos em quatro grupos: controle, Er:YAG, Nd:YAG e combinação Er:YAG/Nd:YAG. Após 14 dias, o grupo combinado apresentou maior densidade mineral óssea e menor espaçamento trabecular ($p < 0,001$), conforme microtomografia. A análise histológica revelou ausência de dano térmico, menor infiltrado inflamatório nos grupos com laser e melhor integração óssea no grupo combinado, sem evidência de necrose. A imuno-histoquímica demonstrou maior expressão de osteocalcina (OC) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), indicando atividade osteoblástica e angiogênese. Concluiu-se que a aplicação combinada dos lasers favoreceu a osseointegração precoce e o reparo ósseo peri-implantar.

Vescovi⁵⁹ *et al* (2024), propuseram uma abordagem cirúrgica combinada para o tratamento da osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos, utilizando cirurgia piezoelétrica, laser Er:YAG para ablação óssea e laser Nd:YAG para fotobiomodulação. O protocolo envolveu a suspensão prévia do denosumabe, terapia medicamentosa com antibióticos e antissépticos, seguida de intervenção cirúrgica minimamente invasiva. Durante o procedimento, foi realizada osteotomia parcial com dispositivo piezoelétrico, remoção de tecido necrótico e vaporização do osso acometido com o laser Er:YAG. A fotobiomodulação com laser Nd:YAG foi aplicada desde o dia da cirurgia, duas vezes por semana, durante quatro semanas. Os resultados evidenciaram cicatrização completa em um mês, sem dor significativa ou sinais de recorrência após quatro anos. A associação dos dois lasers demonstrou efeito sinérgico, promovendo regeneração óssea, controle inflamatório e melhora na resposta

pós-operatória, consolidando-se como uma alternativa eficaz e conservadora no manejo de osteonecrose.

Um estudo experimental recente dos autores Neto⁶⁰ *et al* (2025, avaliou os efeitos da fresagem óssea com laser Er:YAG, associada ou não à fotobiomodulação com laser Nd:YAG, na osseointegração de implantes produzidos por manufatura aditiva em ratos. Os animais foram divididos em quatro grupos, variando entre fresagem convencional e com Er:YAG, com ou sem aplicação de Nd:YAG para fotobiomodulação. Os resultados indicaram que a fresagem com Er:YAG proporcionou maior torque de remoção e, quando combinada ao Nd:YAG, potencializou a expressão de marcadores osteogênicos como RUNX2, fosfatase alcalina (FA), sialoproteína óssea (IBSP) e osteocalcina (OCN). A combinação dos dois lasers demonstrou efeito sinérgico, promovendo melhor estabilidade do implante e resposta biológica aprimorada. Esses achados reforçam o potencial da abordagem laser-assistida como alternativa promissora à técnica convencional de preparo do leito ósseo, no entanto os autores ressaltam a necessidade de estudos adicionais para compreender os efeitos a longo prazo sobre a consolidação óssea e o sucesso clínico dos implantes.

1.8. Justificativa

Diante do estado da arte aludido e das limitações impostas pela tecnologia atual, torna-se necessário investigar novas abordagens que possam favorecer o reparo ósseo ao redor de implantes orais em situações de qualidade óssea comprometida, como ocorre em indivíduos com osteoporose. Essa condição sistêmica, prevalente principalmente em mulheres pós-menopáusicas, impõe desafios relevantes à estabilidade e à integração do implante, especialmente em regiões com densidade óssea reduzida. Nesse contexto, o preparo do leito ósseo com laser de Er:YAG, associado à fotobiomodulação com laser de Nd:YAG, configura uma proposta terapêutica promissora. No entanto, ainda são escassos os estudos experimentais que avaliem de forma integrada os efeitos dessa combinação sobre parâmetros biomecânicos e biológicos da reparação óssea peri-implantar em condições de osteoporose. Considerando que estudos clínicos envolvem custos elevados e longos períodos de acompanhamento, destaca-se a relevância dos modelos animais na pesquisa pré-clínica. Os roedores, em

especial os ratos, são amplamente empregados na investigação da osteoporose por apresentarem vantagens como fácil manejo, crescimento rápido, baixo custo e aceitação ética consolidada. Dessa forma, o presente estudo justifica-se pela necessidade de ampliar o conhecimento sobre os efeitos dos lasers Er:YAG e Nd:YAG na formação óssea periimplantar ao redor de implantes instalados em tecido ósseo com baixa densidade mineral, por meio de modelo experimental validado, com potencial de aplicação clínica futura.

1.9. Hipóteses

Hipótese nula (H_0): a aplicação combinada dos lasers Er:YAG e Nd:YAG no preparo do leito ósseo e na fotobiomodulação, respectivamente, não produz efeito no reparo ósseo ao redor de implantes de titânio em tíbias de ratas, em comparação ao preparo convencional nas mesmas condições de osso de baixa densidade.

Hipótese alternativa (H_1): a aplicação combinada dos lasers Er:YAG e Nd:YAG no preparo do leito ósseo e na fotobiomodulação, respectivamente, produz efeito significativo no reparo ósseo ao redor de implantes de titânio em tíbias de ratas, em comparação ao preparo convencional nas mesmas condições de osso de baixa densidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da aplicação combinada dos lasers Er:YAG no preparo do leito ósseo e Nd:YAG para fotobiomodulação, no reparo ósseo ao redor de implantes de titânio em modelo animal com osteopenia.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar o efeito da combinação do laser Er:YAG e Nd:YAG na resistência ao deslocamento vertical (*Stress*) e na deformação óssea (*Strain*) na região do implante como indicativo de osseointegração.
- b) Avaliar o efeito da combinação do laser Er:YAG e Nd:YAG na produção de colágeno total e na morfologia óssea ao redor do implante
- c) Avaliar o efeito da combinação do laser Er:YAG e Nd:YAG na expressão da fosfatase alcalina como marcador de atividade osteoblástica

3. METODOLOGIA

3.1. Ética

O trabalho foi submetido e aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Nove de Julho sob o protocolo número 6054240624. O documento de aprovação emitido pelo comitê está no Anexo A.

3.2. Análise estatística

Os dados foram inicialmente avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Aqueles com distribuição aproximadamente normal foram apresentados como médias acompanhadas de seus respectivos erros padrão, e analisados por ANOVA, seguido do post-hoc apropriado (Tukey) para comparações entre grupos. Já os dados que não apresentaram evidências de normalidade serão descritos por suas medianas e intervalos interquartis e analisados pelos testes de Friedman ou Kruskal-Wallis (para múltiplos grupos) e pelos testes de Mann-Whitney ou Wilcoxon (para dois grupos). Para múltiplas comparações, foi aplicado o procedimento de correção de Ryan-Holm Bonferroni. O software BioEstat 5.0 foi utilizado para todas as análises estatísticas e o nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$.

3.3. Inteligência artificial

O ChatGPT V4.0 foi utilizado para correção gramatical e melhora geral da legibilidade do trabalho

3.4. Repositório de dados

Os dados apresentados nesta tese podem ser baixados em:

<https://drive.google.com/drive/folders/1NaZcle5M2jsLiT2iCo1xzNH7gQVacbEq?usp=sharing>

3.5. Tamanho amostral

O tamanho amostral foi feito baseado no uso racional de animais bem como nos modelos preconizados pela literatura^{61,62}. Foi determinado durante

todo o procedimento experimental o n total de 48 animais. O número de animais foi obtido a partir de cálculo amostral estatístico, considerando-se um grau de confiança de 95%, determinado através da seguinte equação:

$$N = Z^2 \cdot p(1-p) / d^2$$

Onde N é número de animais; p refere-se à potência estatística (85%); d é o desvio padrão (25%, baseado na literatura), e Z equivale a 1,96, escore para um grau de confiança de 95%. Assim, serão necessários 8 animais por grupo.

3.6. Grupos experimentais

Foram utilizados *Rattus norvegicus* (Rodentia – Muridae) fêmeas, adultas da linhagem Wistar, com idade que entre 3 e 6 meses, saudáveis e com peso aproximado de 180g. Os animais foram obtidos e mantidos no biotério da Universidade Nove de Julho durante todo o período experimental. Eles foram alojados em caixas plásticas apropriadas, devidamente etiquetadas conforme o grupo experimental ao qual pertenciam, com o limite máximo de cinco animais por caixa. As condições ambientais foram rigorosamente controladas: temperatura entre 22°C e 25°C, ciclos alternados de luz e escuro a cada 12 horas, umidade relativa entre 50% e 60% e ventilação artificial. Os animais receberam ração padrão e água *ad libitum*.

Os 48 animais foram divididos em 3 grupos:

Grupo controle (C): não foi realizado o procedimento de ovariectomia e foi realizado o protocolo convencional de perfuração óssea na cirurgia de instalação dos implantes. Metade dos animais sofreram eutanásia com 15 dias, a fim de avaliar a osseointegração precoce e a outra metade com 45 dias.

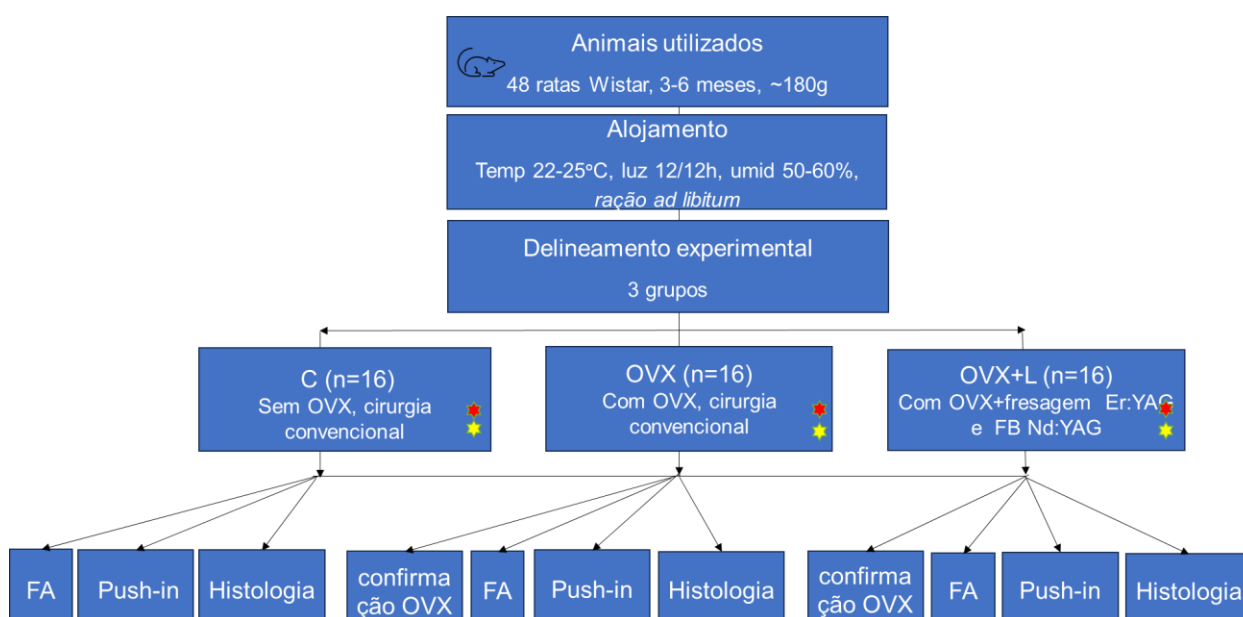
Grupo ovariectomia e cirurgia convencional (OVX): recebeu o protocolo convencional de perfuração na cirurgia de instalação de implantes. Metade dos animais sofreram eutanásia com 15 dias, a fim de avaliar a osseointegração precoce e a outra metade com 45 dias.

Grupo Ovariectomia e cirurgia com laser (OVX+L): todo o procedimento de perfuração óssea foi realizado com o laser de Er:YAG e a fotobiomodulação

com o laser de Nd:YAG. Metade dos animais sofreram eutanásia com 15 dias, a fim de avaliar a osseointegração precoce e a outra metade com 45 dias.

A Figura 1 representa um diagrama com os grupos experimentais e o fluxo de trabalho.

Figura 1 Delineamento experimental. (*) refere-se a eutanásia de metade dos animais após 15 dias da cirurgia de instalação dos implantes. (**) refere-se a eutanásia da outra metade após 45 dias da instalação dos implantes.



Fonte: autor

A Figura 2 representa a linha temporal dos experimentos demonstrando os tempos dos procedimentos cirúrgicos após a OVX, realizados em dias e os tempos de eutanásia.

Figura 2 Linha temporal dos procedimentos. OVX: após 74 dias nos grupos OVX e OVX + LASER os implantes foram instalados. Eutanásia: 15 e 45 dias após as cirurgias de instalação dos implantes.



Fonte: autora

3.7. Ovariectomia (OVX)

A OVX é o modelo de osteoporose em ratos que mimetiza a perda óssea induzida por deficiência de estrogênio e demonstra as manifestações clínicas da osteoporose pós-menopausa⁶³. Os animais foram anestesiados com a associação de Quetamina (80mg/kg) e Xilazina (10mg/kg) via intraperitoneal. Com o animal em decúbito ventral, área da pele foi raspada (com tesoura elétrica), lavada (com clorexidina e etanol 70%) e desinfetada (com iodopovidona). A cirurgia deve ser feita em almofada aquecida (30-35 °C) para prevenir a hipotermia e gel para proteção ocular também é usado⁶⁴.

Uma incisão supra púbica de 5 cm foi realizada com bisturi e a cavidade peritoneal, penetrada através de uma incisão na linha alba. A incisão peritoneal foi estendida até 5 cm com tesoura reta. Os cornos uterinos estão intimamente associados à bexiga e foram facilmente localizados e os ovários facilmente exteriorizados. Os ovários foram removidos por meio de um procedimento de três pinças. O peritônio e o subcutâneo foram fechados com pontos absorvíveis interrompidos 3-0, enquanto suturas simples não absorvíveis interrompidas 3-0 foram utilizados na incisão da pele. Os animais receberam dose única de uma combinação de antibióticos de amplo espectro na dosagem de 570 mg/Kg por via intramuscular (Pentabiótico®, Zoetis, Brasil) e dipirona sódica 500 mg/mL (EMS®, Hortolândia, SP) foi administrada na mamadeira na diluição de 2 mL a cada 300 mL de água filtrada por três dias consecutivos, incluindo o dia da cirurgia. A Figura 3 representa a sequência cirúrgica da OVX realizada nos grupos OVX e OVX+L.

Figura 3 Figuras representativas do procedimento de ovariectomia. (A) anestesia intraperitoneal (B) Incisão de 5 cm na linha peritoneal (C) Localização e remoção dos ovários (D) suturas por camadas



Fonte: (A) site biotério UNINOVE (B e D) Lasota, (2004) (C) autora

Após a cirurgia, os animais foram alojados individualmente por uma semana, com maravalha limpa e seca, evitando-se hipotermia e possível contaminação. Os animais foram observados durante todo o período de pós-operatório pela pesquisadora para cuidados com a ferida cirúrgica.

3.8. Coleta e exames para confirmação da efetividade da OVX

O ciclo estral de ratas é composto por quatro fases distintas, cuja identificação é baseada na análise dos tipos celulares presentes no lavado vaginal. O ciclo estral de ratas é composto por quatro fases distintas, cuja identificação é baseada na análise dos tipos celulares presentes no lavado vaginal. A fase de proestro é caracterizada pela maturação folicular, acompanhada por um aumento na produção de estrogênio e pelo predomínio de células epiteliais nucleadas. Em seguida, ocorre o estro, fase em que a ovulação se manifesta e há predominância de células corneificadas. O metaestro corresponde ao período de formação do corpo lúteo, marcado pelo pico de secreção de progesterona e pela presença de leucócitos, células epiteliais

nucleadas e corneificadas. Por fim, a fase de diestro caracteriza-se como um estágio de quiescência, no qual há predominância de leucócitos polimorfonucleares, especialmente neutrófilos⁶⁵. Após a remoção dos ovários, as ratas deixam de apresentar o ciclo estral de forma permanente, e o esfregaço vaginal passa a ser caracterizado pela presença abundante de neutrófilos dispersos, conferindo uma aparência semelhante a um "céu estrelado", semelhante à fase de diestro. Além disso, observa-se um epitélio atrófico, reflexo da ausência de estímulos hormonais, o que impede a maturação das células do epitélio escamoso⁶⁶.

A eficácia do OVX foi avaliada pela análise das características morfológicas das células em esfregaços vaginais sete dias após as cirurgias. Utilizou-se uma ponteira na pipeta contendo 0,1mL de solução salina tamponada (PBS) que foi inserida cerca de 5 mm na cavidade vaginal. O PBS foi dispensado e aspirado por 3 vezes consecutivas apertando e soltando o bulbo sem remover a ponteira do local e na última foi aspirada todo lavado, que pode apresentar secreção viscosa ou turva. Em seguida, foi preparado o esfregaço transferindo a secreção para uma lâmina de vidro identificada e coradas com cristal violeta 1% (Newprov/Pinhais/PR). Foram cobertas com uma lamínula e observadas através do microscópio óptico (Nikon Eclipse E200MV - Nikon Corporation Tokyo – Japan) com aumento de 100x (ocular de 10x e objetiva de 10x)⁶⁵.

Após a eutanásia o útero e as tubas uterinas restantes de cada animal, foram retirados e colocados em microtubos (Eppendorf do Brasil Ltda. São Paulo) para pesagem e confirmação da atrofia acentuada.

3.9. Cirurgias para instalação dos implantes

3.9.1. Cirurgia convencional no grupo C e OVX

Este procedimento foi realizado nos grupos C e no grupo OVX para a instalação dos implantes de titânio. No segundo grupo, esta foi realizada após o período de 74 dias da OVX⁶². Os animais foram anestesiados com a associação de 80mg/Kg de cloridrato de cetamina 10% injetável (Syntec, Tamboré, SP, Brasil) e 10 mg/Kg cloridrato de xilazina 2% (Syntec, Tamboré, SP, Brasil) via intraperitoneal.

Realizou-se a tricotomia na parte medial das tíbias traseiras direita e esquerda (com tesoura elétrica) que foram lavadas e desinfetadas com clorexidina e etanol 70% e o colírio Lacribell® (Cristalia, Itapira, SP, Brasil) para hidratação e proteção ocular também foi utilizado (1). As incisões de aproximadamente 1 cm sobre a tuberosidade das tíbias foram realizadas com lâminas 15C (Swann-Morton, Inglaterra) e a dissecação delicada do tecido foi feita com elevadores periosteais, expondo o osso para receber os implantes. Um total de 60 implantes de titânio medindo 2,7mm de comprimento e 1,4mm de diâmetro (SIN®, São Paulo, SP, Brasil) foram instalados (2 por animal).

Foram utilizadas 2 fresas as para preparar o leito de implantação. A broca lança foi utilizada para marcar o ponto de perfuração seguida por uma broca espiral de 1,2mm de largura calibrada com o comprimento do implante (2.7mm) (SIN®, São Paulo, SP, Brasil) acoplada a um motor elétrico (Surgic Pro SG70M®, NSK, Japão), regulado a uma velocidade de 1200 rpm, sob irrigação abundante com solução isotônica de cloreto de sódio 0,9% (Physiological®, Laboratórios Biosintética Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil) e um contra ângulo de redução 20:1 (SG20®, NSK, Japão).

A Figura 4 representa a fresa de 1.2 mm com a medida de perfuração no comprimento do implante que foi instalado.

Figura 4 Implante SIN® ao lado da fresa utilizada nas cirurgias convencionais.

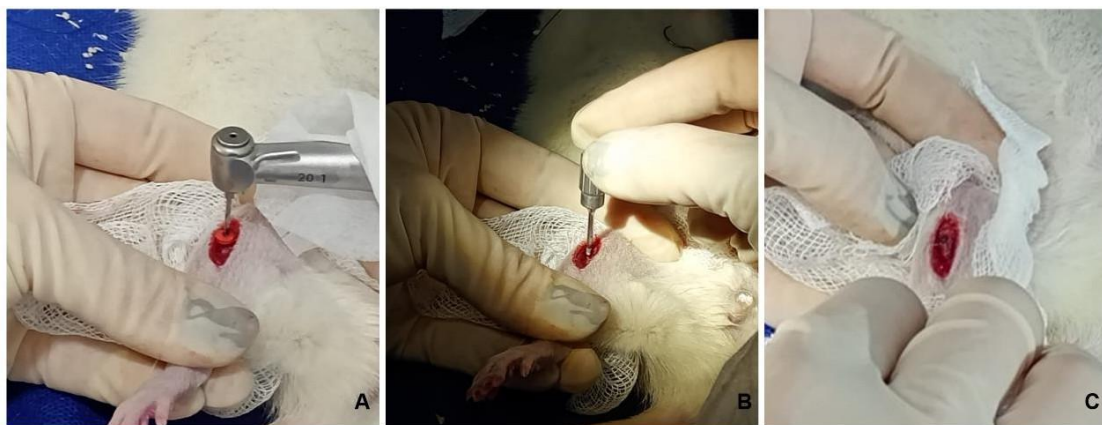


Fonte: autora.

Os implantes foram colocados com auxílio de chave digital do tipo hexagonal 0,9mm (SIN®, São Paulo, SP, Brasil). Os tecidos foram devidamente alinhados e suturados com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil).

A Figura 5 ilustra a sequência de perfuração e instalação dos implantes com a chave digital manual.

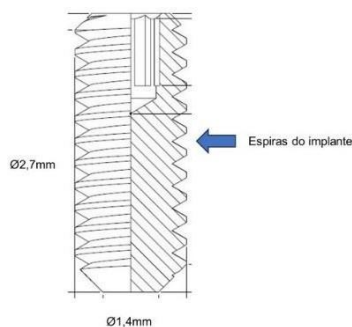
Figura 5 A) perfuração com a fresa SIN® 1.2mm calibrada no comprimento do implante (2,7mm) 6B) instalação dom implante com chave manual hexagonal 0,9mm SIN® 6C) implante instalado a nível ósseo



Fonte : autora

A Figura 6 representa o desenho do implante utilizado com as medidas de comprimento e largura.

Figura 6 Desenho do implante de titânio SIN®

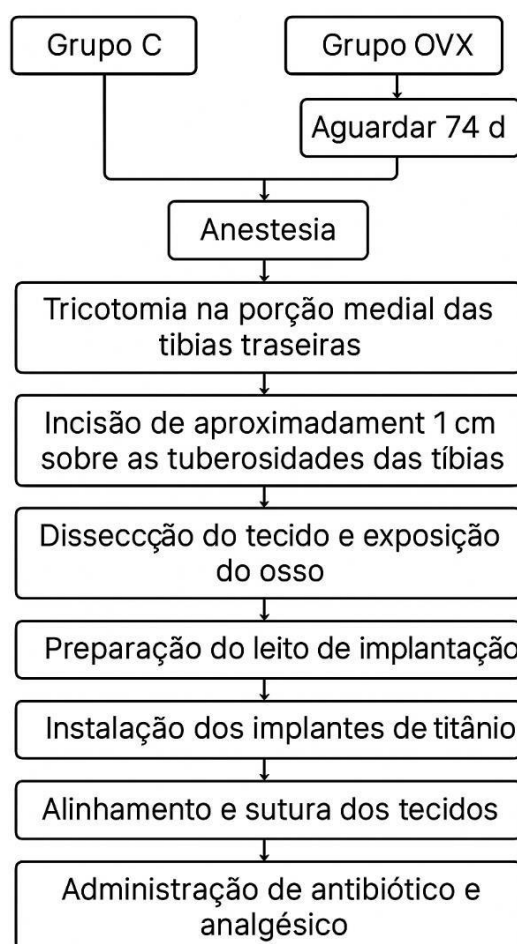


Fonte: SIN® (modificado)

Os animais receberam dose única de uma combinação de antibióticos de amplo espectro na dosagem de 570 mg/Kg por via intramuscular (Pentabiótico®, Zoetis, Brasil) e dipirona sódica 500mg/mL (EMS®, Hortolândia, SP) foi administrada na mamadeira, na diluição de 2 mL a cada 300 mL de água filtrada por três dias consecutivos, incluindo o dia da cirurgia. Todos os procedimentos foram realizados pela mesma cirurgiã-dentista. Os animais foram observados durante todo o período de pós-operatório pela pesquisadora para cuidados com a ferida cirúrgica.

A Figura 7 descreve a sequência do procedimento cirúrgico convencional realizado nos grupos C e OVX.

Figura 7 Sequência do procedimento cirúrgico de instalação dos implantes nas tíbias dos animais dos grupos C e OVX



Fonte: autora

3.9.2. Procedimento cirúrgico a laser

Os parâmetros dosimétricos utilizados neste grupo foram definidos com base na literatura⁶⁰ e em resultados obtidos a partir de um teste piloto realizado em tíbias de carcaças de ratas, as quais foram anteriormente utilizadas para o treinamento da operadora na técnica de ovariectomia.

Após a incisão e exposição do local de implantação nas tíbias, a guia de perfuração foi posicionada para a marcação do leito cirúrgico. Este guia de perfuração foi confeccionado em uma tira de aço de 7mm de largura perfurada com a fresa 1.2mm (SIN®, São Paulo, SP, Brasil) para a padronização do diâmetro da osteotomia⁶⁷. O laser utilizado foi o Er:YAG (LightWalker AT, Fotona®, Eslovênia) com comprimento de onda de $\lambda = 2940$ nm. O procedimento utilizou a peça de mão H14 equipada com uma ponta cônica (Sapphire 800/12), fornecendo 390 mJ de energia, uma frequência de 12 Hz, com potência média de 4,65 W sem contato. A profundidade da perfuração foi realizada de forma visual, introduzindo a ponta do laser no preparo lentamente. Aproximadamente 60 segundos foram necessários para o preparo do leito cirúrgico em cada tíbia, podendo variar cerca de 5 segundos, dependendo da espessura da tíbia.

O laser operou no modo de pulso QSP (quase contínuo), irrigando o alvo com água ajustada no nível de potência 3 (ajuste do equipamento). O líquido para irrigação de resfriamento foi aplicado para evitar o superaquecimento do tecido ósseo. A Figura 8 representa o guia de perfuração confeccionado.

Figura 8 Tira de aço perfurada com a fresa 1.2mm SIN® utilizada para marcação do diâmetro da perfuração com o laser de Er:YAG.



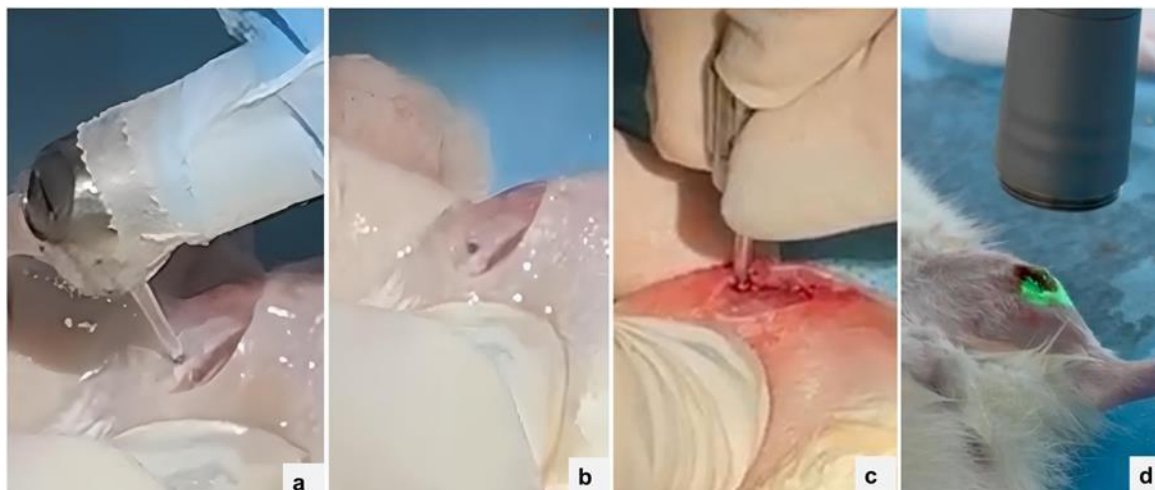
Fonte: autora.

Após o término do preparo do leito, o laser Er:YAG foi utilizado para a limpeza do alvéolo por aproximadamente 30s objetivando melhorar a osseointegração. Para este processo, a peça de mão H14 equipada com uma ponta cônica (Sapphire 800/12) foi introduzida dentro do alvéolo sem contato com as paredes, fazendo uma varredura por toda a parede do preparo para remover toda a *smear layer*. Foram utilizados os seguintes parâmetros 40 mJ de energia, uma frequência de 12 Hz, com potência média de 0,45 W, sem contato, no modo Sweeps e com a água ajustada no nível de potência 3 conforme preconizado por Zhao *et al.* ²⁴.

Após a instalação do implante no alvéolo cirúrgico com a chave hexagonal 0,9 mm (SIN®, São Paulo, SP, Brasil) de forma manual, a fotobiomodulação foi realizada com um laser Nd:YAG (LightWalker AT, Fotona®, Eslovênia), com comprimento de onda de 1064 nm. O tratamento foi aplicado usando a peça de mão MarCo™S com tamanho da ponta de 10,3 mm, energia total de 45J, frequência de 15 Hz, potência média de 0,5W e modo de pulso MSP (100 µs) e saída de energia por pulso de 50 mJ sobre o tamanho do ponto do feixe por 60 segundos.

Figura 9 (a, b, c, d) ilustra a sequência cirúrgica com a utilização dos lasers de Er:YAG e Nd:YAG para a instalação dos implantes no grupo OVX+L.

Figura 9 a) início da ablação óssea com laser Er:YAG no ponto de instalação do implante, b) aspecto final do sítio de instalação do implante c) instalação de forma manual com chave hexagonal 0.9 SIN®. d) Fotobiomodulação com laser de Nd:YAG



Fonte: autora

A Tabela 1 descreve os parâmetros dosimétricos utilizados em todas as etapas do procedimento realizado com a utilização dos lasers de Er:YAG e Nd:YAG.

Tabela 1 Parâmetros utilizados para o preparo e limpeza do leito ósseo e para a fotobiomodulação na instalação dos implantes no grupo OVX+L

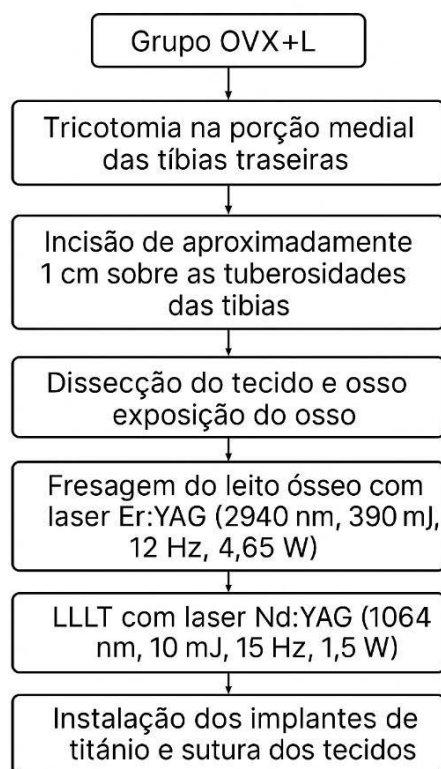
Parâmetro	Er:YAG – Preparo do Leito Ósseo	Er:YAG – Limpeza do Alvéolo	Nd:YAG – Fotobiomodulação
Tipo de laser	Er:YAG	Er:YAG	Nd:YAG
Equipamento	LightWalker AT (Fotona®, Eslovênia)	LightWalker AT (Fotona®, Eslovênia)	LightWalker AT (Fotona®, Eslovênia)
Comprimento de onda	2940 nm	2940 nm	1064 nm
Peça de mão utilizada	H14	H14	MarCo™ S
Ponta utilizada	Sapphire 800/12 (cônica)	Sapphire 800/12 (cônica)	10,3 mm (spot size)
Energia por pulso	390 mJ	40 mJ	50 mJ
Energia total	280,8 J	14,4 J	45 J
Frequência	12 Hz	12 Hz	15 Hz
Potência média	4,65 W	0,45 W	0,5 W

Modo de operação	QSP	Sweeps	MSP (100 μ s)
Duração da aplicação	60 s	30 s	60 s
Modo de aplicação	Sem contato	Sem contato	Sem contato
Grupo experimental	OVX+L	OVX+L	OVX+L
Finalidade da aplicação	Preparo do leito ósseo	Lavagem do alvéolo do implante	Fotobiomodulação
Tempo de pulso	50 μ s	50 μ s	100 μ s
Ciclo útil	0,06%	0,12%	0,1%
Potência pico	7,8 kW	800 W	500 W

Fonte: autora

Os tecidos foram devidamente alinhados e suturados com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil). Os animais receberam dose única de uma combinação de antibióticos de amplo espectro na dosagem de 570 mg/Kg por via intramuscular (Pentabiótico®, Zoetis, Brasil) e dipirona sódica 500mg/mL (EMS®, Hortolândia, SP) foi administrada na mamadeira, na diluição de 2 mL a cada 300 mL de água filtrada por três dias consecutivos, incluindo o dia da cirurgia. Todos os procedimentos foram realizados pela mesma cirurgiã-dentista. Os animais foram observados durante todo o período de pós-operatório pela pesquisadora para cuidados com a ferida cirúrgica. A Figura 10 descreve a sequência do procedimento cirúrgico realizado no grupo OVX+L.

Figura 10 sequência dos procedimentos cirúrgicos realizados com os lasers de Er:YAG e Nd:YAG para perfuração, FBM e instalação dos implantes no grupo OVX+L



Fonte: autora

3.10. Eutanásia e coleta das amostras

Conforme o delineamento experimental, após 15 e 45 dias da instalação dos implantes, as ratas foram anestesiadas para a coleta de 2ml de sangue (*in vivo*) através da punção cardíaca com seringa de 3ml e agulha 25/7 descartável.

O sangue foi acondicionado em micro tubo, sem o uso de anticoagulante e mantido na vertical em estante própria no gelo. Os tubos foram identificados numericamente respeitando a sequência dos grupos. Após 20 minutos da coleta os tubos, contendo a amostra de sangue, foram centrifugados (Thermo Scientific™ - Microcentrífuga Fresco™ 21) a 5.000 rpm por 10 minutos na temperatura de 4°C para a separação do soro e plasma. O soro foi transferido com uma pipeta para um novo micro tubo identificado e armazenado em freezer (-80°C) até a realização da análise bioquímica. Em seguida os animais foram anestesiados com hiperdosagem de cetamina (400mg/Kg) e cloridrato de xilazina (40mg/Kg) para a eutanásia.

Durante a coleta, as tíbias foram distribuídas aleatoriamente entre as diferentes análises, garantindo que as duas amostras de um mesmo animal não fossem destinadas ao mesmo tipo de análise. Para as análises histológicas 4 tíbias de cada grupo nos 2 tempos foram armazenadas em tubos plásticos tipo Falcon de 50 mL contendo 40 mL de formol a 10% em temperatura ambiente. Para a análise biomecânica, 5 tíbias de cada grupo nos dois tempos foram lavadas com soro fisiológico estéril e colocadas em microtubos. As amostras foram identificadas e transferidas imediatamente para uma garrafa térmica contendo nitrogênio líquido. Ao término de todas as eutanásias foram levadas ao freezer (-80°C).

3.11. Análise biomecânica (teste push-in)

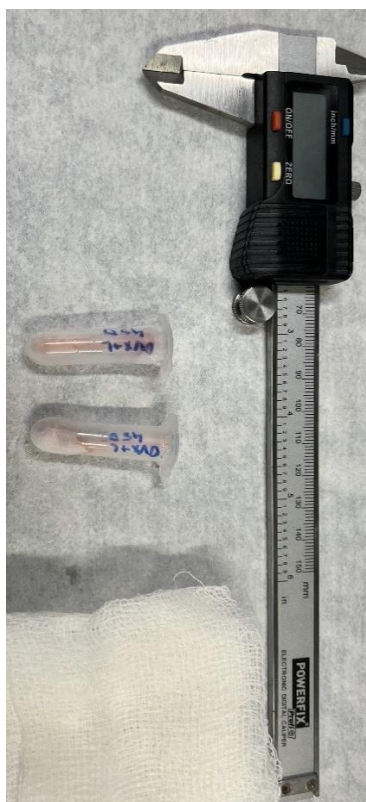
A aplicação do teste biomecânico *push-in* tem se consolidado como uma abordagem experimental robusta e sensível para a avaliação da estabilidade inicial de implantes ósseos, especialmente em modelos pré-clínicos. Em estudos recentes, como os que investigaram diferentes topografias de superfície e intervenções de biofuncionalização, o teste *push-in* demonstrou elevada capacidade para detectar variações na resistência à micromobilização, mesmo em períodos precoces de cicatrização.^{68,69} Adicionalmente, ao ser aplicado em diferentes períodos de cicatrização, o teste revelou sua capacidade de monitorar a evolução da integração óssea ao longo do tempo.⁷⁰

Este teste mede a resistência ao deslocamento vertical (*Stress*) do osso quando uma carga é aplicada verticalmente no implante e deformação óssea (*Strain*) na região do implante, como indicativo de osseointegração precoce e tardia.

Inicialmente as tíbias foram descongeladas de forma sequencial e usadas em temperatura ambiente, para não ficarem expostas por muito tempo. Na região do implante foram medidas a largura e altura de cada tíbia, com um paquímetro eletrônico digital (Powerfix® Profi+, Stiftsbergstrabe, Alemanha) para estabelecer uma proporção entre medidas e força aplicada, compensando desta forma, a diferença de tamanhos entre as tíbias.

A Figura 11 mostra o paquímetro eletrônico digital utilizado na medição das amostras utilizadas no teste push-in.

Figura 11 Paquímetro eletrônico digital da marca Powerfix® Prof+ ao lado das amostras descongeladas.

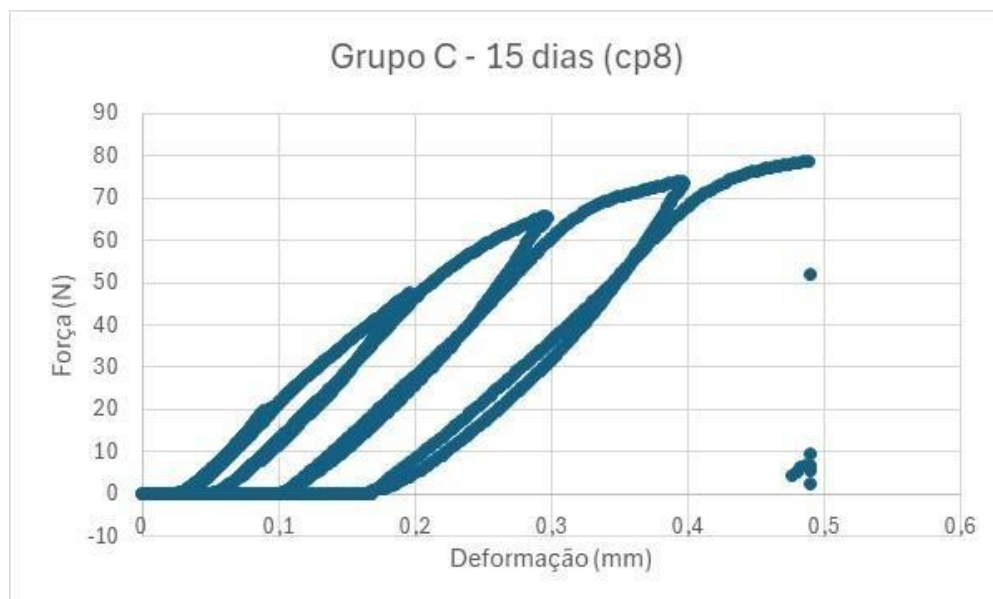


Fonte: autora

O dispositivo para ensaio foi equipado com uma célula de carga de 500 N e uma haste de compressão (diâmetro de 0,8mm) foi usada para carregar o implante verticalmente para baixo a uma velocidade de 1 mm/min.

O valor do teste *push-in* foi determinado como a carga do ponto de ruptura delineada como a carga máxima antes de uma rápida diminuição na curva de carga-deslocamento. O gráfico o deve mostrar em seu eixo Y e X força de ruptura máxima e deformação máxima respectivamente. A Figura 12 mostra um gráfico de dispersão representativo gerado no ensaio do corpo de prova 8 (cp8) do grupo C no tempo de eutanásia de 15 dias.

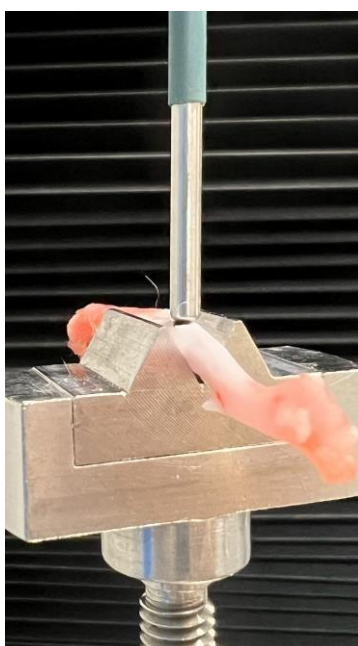
Figura 12 Gráfico de dispersão do cp8 do grupo controle no tempo de eutanásia de 15 dias.



Fonte: autora

A Figura 13 ilustra o teste *push-in* realizado nas amostras no aparelho de teste mecânico (Intermetric linha iM-2- célula de carga com capacidade máxima de 2kN (200kgf) - Intermetric Instrumentos - Mogi das Cruzes-SP) no laboratório de fisiologia translacional da UNINOVE.

Figura 13 foto ilustrativa do ensaio biomecânico (teste push-in) mostrando a haste carregando o implante verticalmente para baixo.



Fonte: autora

3.12. Análise bioquímica – atividade sérica da fosfatase alcalina

A dosagem da FA foi incluída nas análises por se tratar de um marcador bioquímico amplamente utilizado na investigação de distúrbios do metabolismo ósseo, como a osteoporose. Sua avaliação permite detectar alterações na atividade osteoblástica. Níveis elevados de FA podem indicar aumento da formação óssea. Esse exame é particularmente útil para avaliar o estado da remodelação óssea.⁷¹

Em meio alcalino a FA sérica catalisa a hidrólise do p-nitrofenilfosfato, liberando p-nitrofenol e fosfato inorgânico. O p-nitrofenol gerado apresenta alta absorvância em 405 nm, sendo sua concentração proporcional à atividade enzimática da FA na amostra, conforme metodologia modificada descrita por McComb⁷² *et al.* (1981).

Para a quantificação da FA nas amostras de soro, utilizou-se o protocolo laboratorial pelo método cinético-colorimétrico (Bowers e Mc Comb modificado) e a absorvância foi registrada pelo espectrofotômetro Anthos 2020® (Biochrom Ltd. Cambridge, UK) com filtro azul (450nm) a 37°C em modalidade singlepoint. Foi utilizado o Kit comercial de fosfatase alcalina liquiform vet da marca Labtest® (Labtest Diagnóstica. MG, Brasil) em placas de 96 poços, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Anexo C).

A reação para detecção da concentração de FA(U/l) seguiu as seguintes etapas: foi realizado o preparo do Reagente de Trabalho (RT) utilizando os dois reagentes distribuídos adequadamente no kit de FA. Para o preparo do RT o conteúdo do frasco do reagente 2 foi transferido para um frasco do reagente 1 e homogeneizado por inversão. Após o preparo do RT, foi pipetado 25µl do substrato e 125µl do RT em cada poço por triplicata, e a placa foi incubada a 37°C durante 2 minutos. Imediatamente após, foram realizadas 2 leituras de cada placa. Os cálculos foram realizados segundo o protocolo recomendado pelo fabricante e o resultado da atividade de FA foi obtido pela subtração da segunda leitura (A2) da primeira (A1), dividido por 2 e multiplicado pelo fator de atividade da fosfatase (2764) conforme cálculo abaixo:

$$\Delta A \text{ Teste} = \frac{A2 - A1}{2}$$

Por fim, a atividade da FA foi obtida utilizando a equação abaixo:

$$FA = \Delta A_{\text{Teste}} \times 2764$$

3.13. Análise morfológica - histologia

Foram coletadas 4 a 6 tíbias de cada grupo, nos 2 tempos de eutanásia (15 e 45 dias). Os implantes de titânio foram removidos com uma chave digital do tipo hexagonal 0,9mm (SIN®, São Paulo, SP, Brasil) no sentido anti-horário e descartados. As tíbias foram encaminhadas para o laboratório especializado Histocell, SP para o preparo das lâminas e receberam o seguinte processamento: foram fixadas em formalina tamponada a 10% (Merck) por 72 horas e descalcificadas em EDTA 4% (Merck). Posteriormente foram desidratadas através de uma série gradativa de banhos de álcool começando em 50% e terminando em álcool absoluto (100%) e finalmente, embebidas em blocos de parafina fundida até o endurecimento completo.

Na região central do defeito ósseo foram obtidos cortes no sentido transversal de 5µm de espessura, usando o micrótomo (LEICA RM 2125 RT) e montados em lâminas permanentes e coradas com Hematoxilina-Eosina (H.E) e Picrosirius *red*.

Para o estudo descritivo das lâminas coradas em H.E, foi utilizado um microscópio óptico (Nikon Eclipse E200MV - Nikon Corporation Tokyo – Japan) acoplado a um sistema de captura de imagens, câmera digital de 5.0MP USB. Para as lâminas coradas em H.E as fotomicrografias foram obtidas no aumento de 100x (ocular de 10x e objetiva de 10x) para verificação da morfologia e da qualidade óssea através da identificação do tecido ósseo cortical (C), tecido ósseo medular (M), tecido de transição/imaturo (T)⁷³.

3.14. Análise de Colágeno total

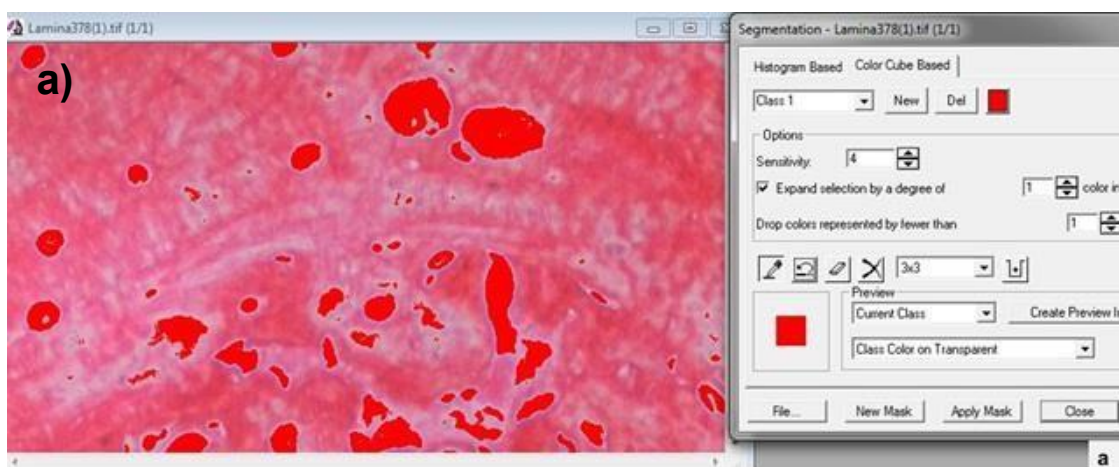
O processamento das lâminas coradas em Picrosirius *red*, seguiu a mesma metodologia explanada no item anterior. As fotomicrografias foram obtidas no aumento de 400x (ocular de 10x e objetiva de 40x) para avaliação da porcentagem de colágeno total. Realizou-se a análise das imagens através do

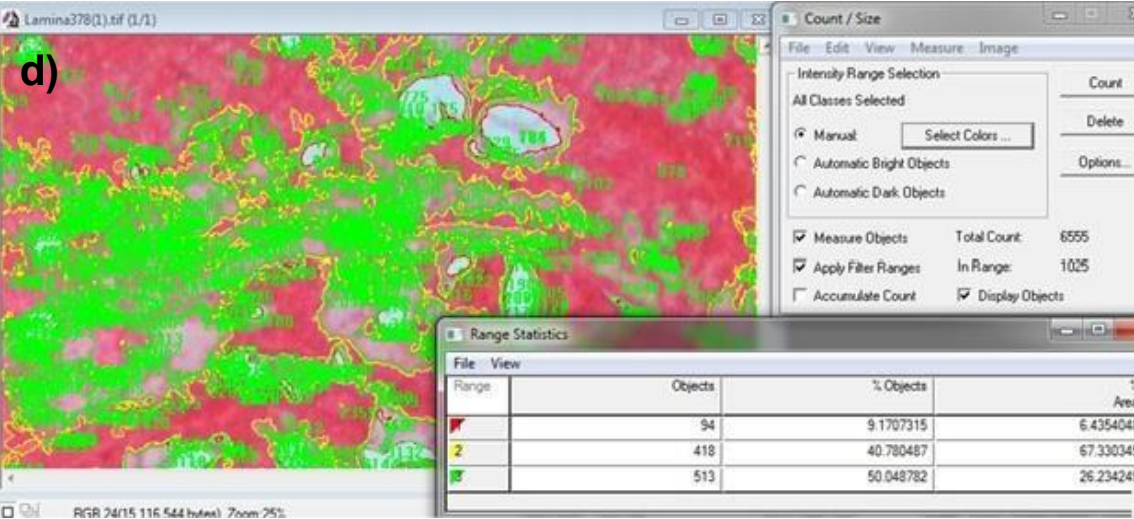
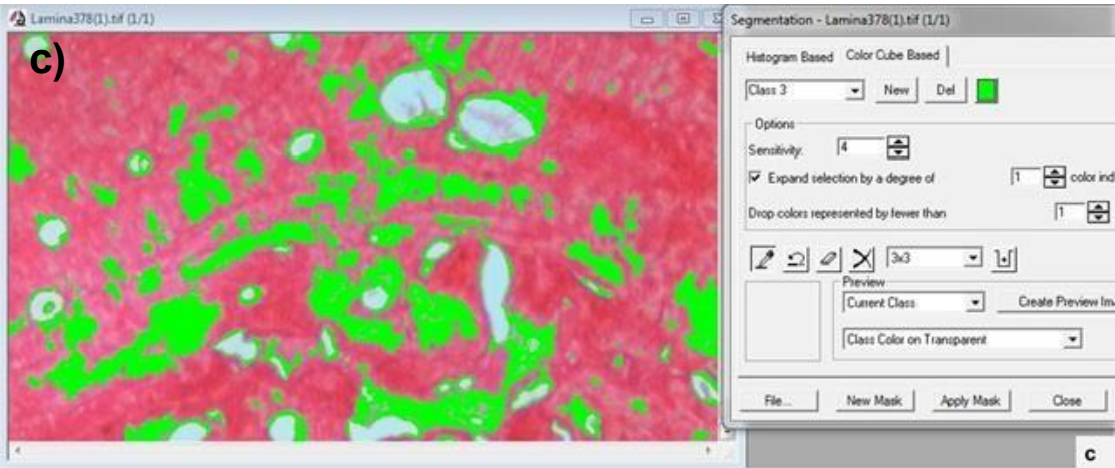
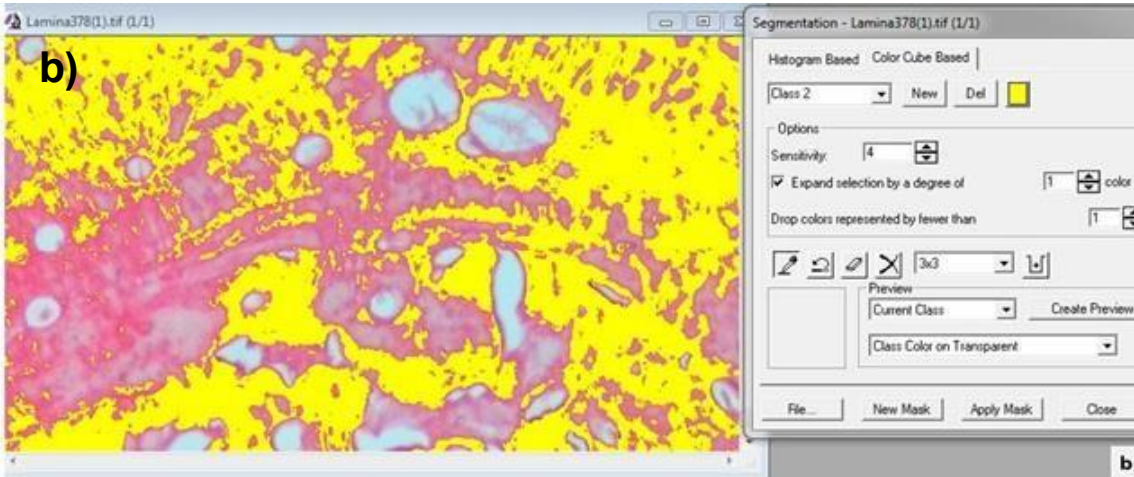
Software ImageJ Pro Plus 6.0.0 260 versão para Windows 2000/XP Professional, Copyright© 1993-2006 Media Cybernetics, Inc.

Este programa identifica o colágeno baseado em cores. Conforme pode ser observado na Figura 14 a) vermelha foi utilizada para marcação dos espaços vazios, que não fazem parte da quantificação. A cor amarela (Figura 14 b) foi utilizada para marcar o colágeno mais imaturo e a cor verde (Figura 14 c) para identificar o colágeno mais claro, em processo de mineralização. Os resultados foram expressos em área percentual e quantificados em Pixels (Figura 14 d).

Foram selecionadas três ratas por grupo para esta análise. De cada rata foi selecionada uma lâmina contendo um corte histológico na região do implante e foi realizado o procedimento acima aludido em triplicata. A porcentagem total de colágeno foi obtida levando em consideração divisão da quantidade do colágeno marcado em amarelo pela somatória da quantidade de colágeno marcado em amarelo com a marcada em verde. A Figura 14 (a, b, c e d) demonstram a sequência de etapas para a quantificação do colágeno total, a partir da fotomicrografia com aumento de 400x, de uma lâmina corada em *Picrosirius red* no programa Image Pro Plus 6.0.0.

Figura 14 Sequência de imagens representativas das fotomicrografias de uma lâmina corada com *Picrosirius red* com aumento de 400x para quantificação do colágeno em Pixels. A Fig 14 a) representa os espaços vazios marcados em vermelho, b) representa o colágeno imaturo marcado em amarelo, c) representa o colágeno mineralizado e d) a contagem dos Pixels.





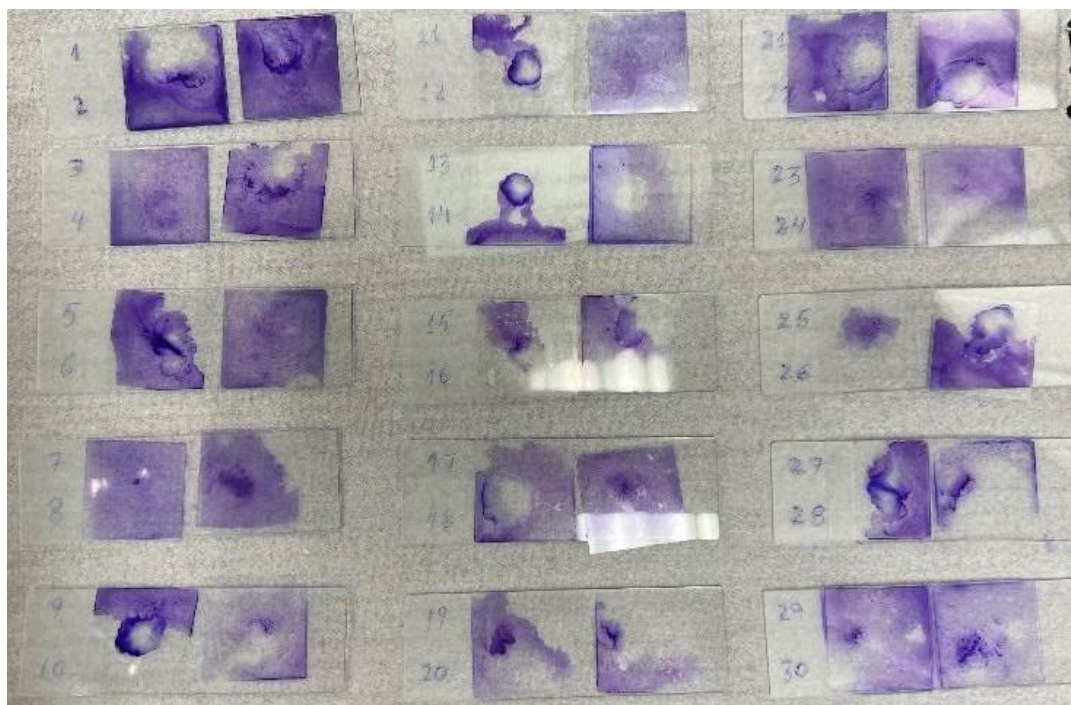
4. RESULTADOS

Um animal não sobreviveu à anestesia durante o procedimento de ovariectomia. Outro, teve que ser submetido a eutanásia 5 dias após o procedimento, pois a ferida abdominal não cicatrizou expondo o peritônio. Com essas perdas, o n total foi ajustado para 45 animais.

4.1. Confirmação da efetividade da OVX

A característica clínica atrófica dos cornos uterinos e a diferença de peso quando comparados com úteros das ratas do grupo controle, bem como a análise do ciclo estral, confirmaram o sucesso da OVX. As lâminas contendo esfregaço vaginal das ratas ovariectomizadas foram coradas com cristal violeta e demonstraram a predominância de neutrófilos o que caracteriza o diestro. A Figura 15 representa as lamínulas do esfregaço vaginal das 30 ratas ovariectomizadas.

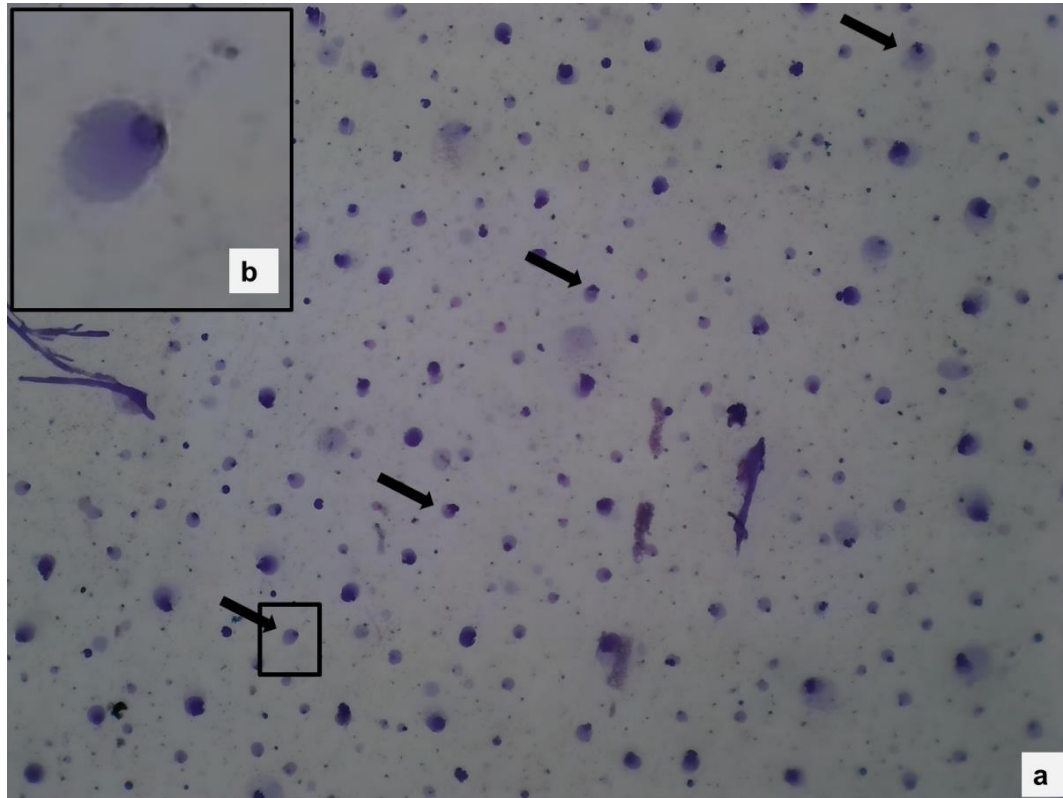
Figura 15 Lamínulas de todas as ratas que foram ovariectomizadas.



Fonte: autora

A Figura 16 (a, b) ilustra o esfregaço vaginal

Figura 16 a) Fotomicrografia (100x) do esfregaço vaginal mostrando um grande número de neutrófilos dispersos b) foto ampliada de um neutrófilo

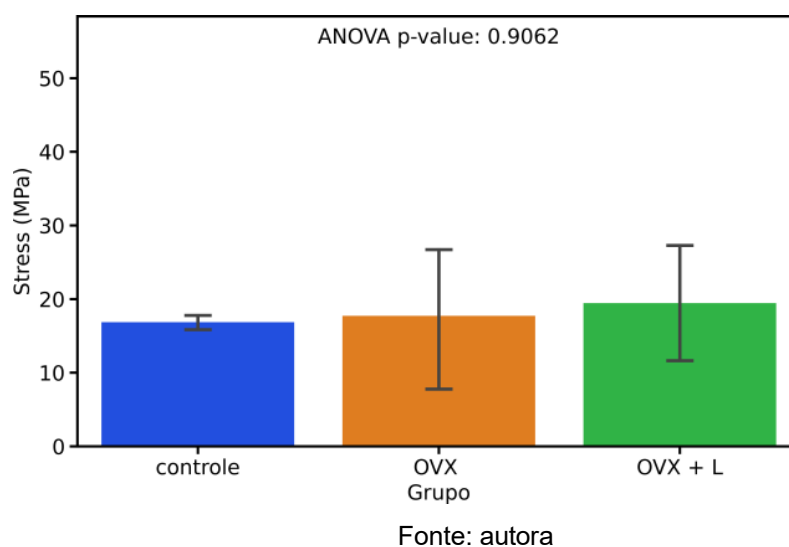


Fonte: autora

4.2. Análise da Stress (MPa)

A Figura 17 mostra a média dos dados para a medida *Stress* (MPa) aos 15 dias após a instalação do implante nos grupos C, OVX e OVX+L.

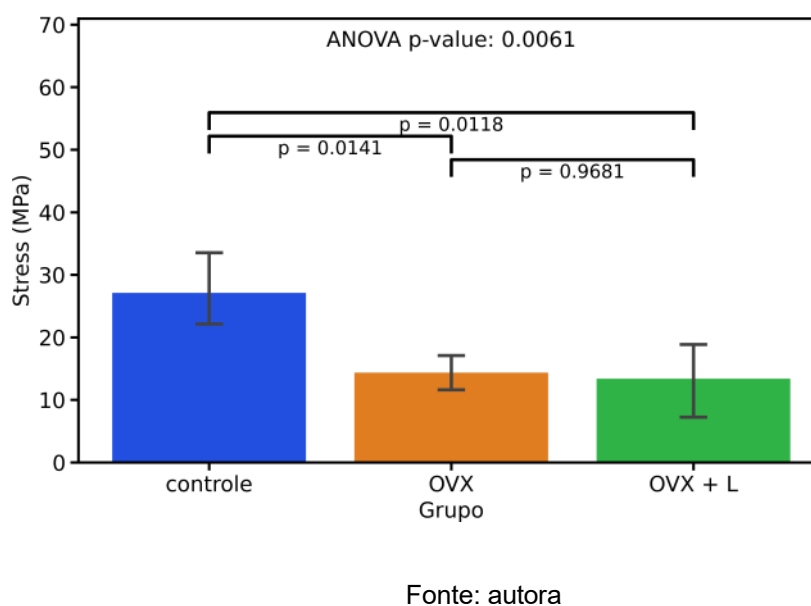
Figura 17 Gráfico de barras dos dados da medida Stress (MPa) aos 15 dias. As barras de erro representam os erros padrão



A análise inferencial dos dados apresentados na figura 17 sugere ausência de diferença significativa entre os grupos estudados ($p = 0.9062$, ANOVA), portanto as diferenças observadas são devidas às flutuações aleatórias inerentes ao processo de medição.

A Figura 18 mostra a de média dos dados para a medida *Stress* (MPa) aos 45 dias após a instalação do implante nos grupos C, OVW e OVX+L.

Figura 18 Gráfico de barras dos dados da medida Stress (MPa) aos 45 dias. As barras de erro representam os erros padrão



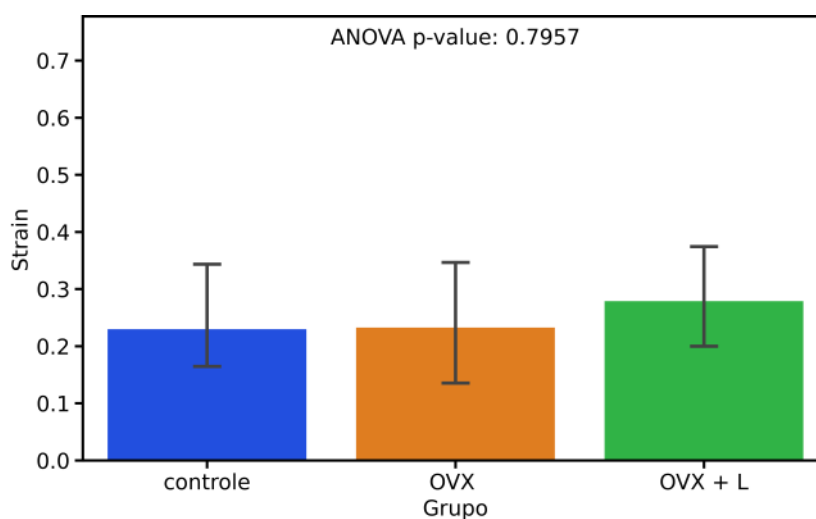
A análise inferencial dos dados apresentados na Figura 18 sugere indícios de diferença significativa entre pelo menos um dos grupos estudados ($p = 0.0061$, ANOVA), portanto foi utilizado o teste de Tukey para determinar a localização da(s) diferença(s). Foram encontradas diferenças significantes entre os seguintes grupos: OVX e controle ($p = 0.0141$); OVX + L e controle ($p = 0.0118$).

A comparação entre 15 e 45 dias mostrou diferença significativa para o grupo controle ($p = 0.0261$, teste t) e ausência de diferença significativa para os demais grupos ($p = 0.6498$ e $p = 0.4536$ para os grupos OVX e OVX + L, respectivamente, Teste t)

4.3. Análise da Strain

A Figura 19 mostra a média dos dados para a medida *Strain* aos 15 dias após a instalação do implante nos grupos C, OVX e OVX+L.

Figura 19 Gráfico de barras dos dados da medida *Strain* aos 15 dias. As barras de erro representam os erros padrão

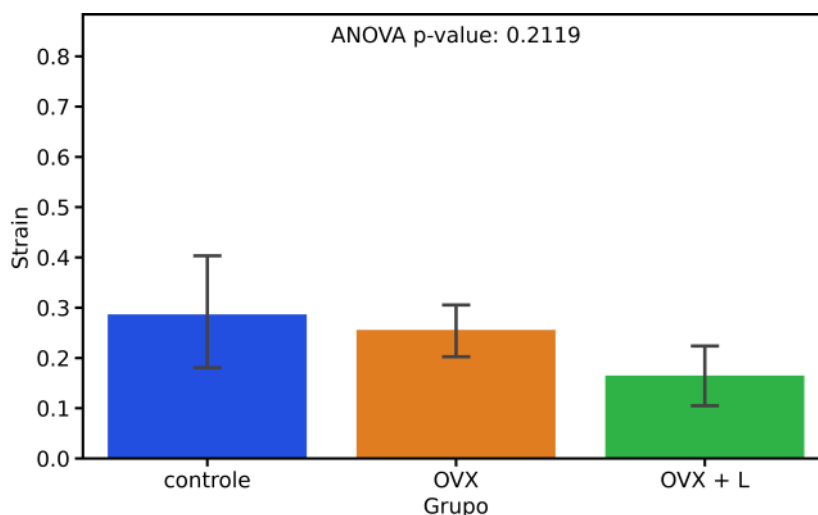


Fonte: autora

A análise inferencial dos dados apresentados na Figura 19 sugere ausência de diferença significativa entre os grupos estudados ($p = 0.7957$, ANOVA), portanto as diferenças observadas são devidas às flutuações aleatórias inerentes ao processo de medição.

A Figura 20 mostra o gráfico de médias dos dados para a medida *Strain* em 45 dias

Figura 20 Gráfico de barras dos dados da medida *Strain* aos 45 dias. As barras de erro representam os erros padrão



Fonte: autora

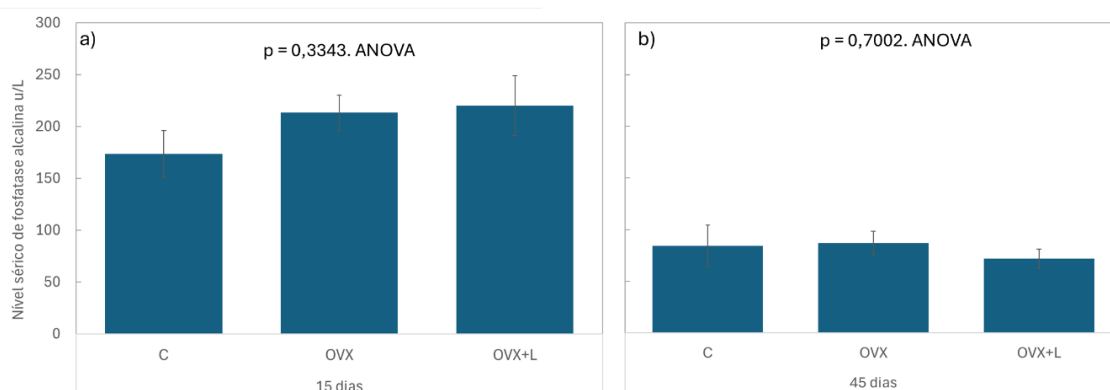
A análise inferencial dos dados apresentados na Figura 20 sugere ausência de diferença significativa entre os grupos estudados ($p = 0.2119$, ANOVA), portanto as diferenças observadas são devidas às flutuações aleatórias inerentes ao processo de medição.

A comparação entre 15 e 45 dias mostrou ausência de diferença significativa para todos os grupos ($p = 0.5283$, $p = 0.8306$ e $p = 0.1434$ para os grupos C, OVX e OVX + L, respectivamente, Teste t)

4.4. Análise Bioquímica – Atividade sérica da FA

A Figura 21 mostra o Gráfico com os níveis séricos de FA em unidades por litro (u/L) nos diferentes grupos experimentais em dois tempos distintos de avaliação: 15 e 45 dias.

Figura 21 Gráfico com os níveis séricos de fosfatase alcalina (u/L) por grupo experimental nos tempos de avaliação de 15 dias (a) e 45 dias (b) após a instalação dos implantes de titânio. As barras de erro representam os erros padrão.



Fonte: autora

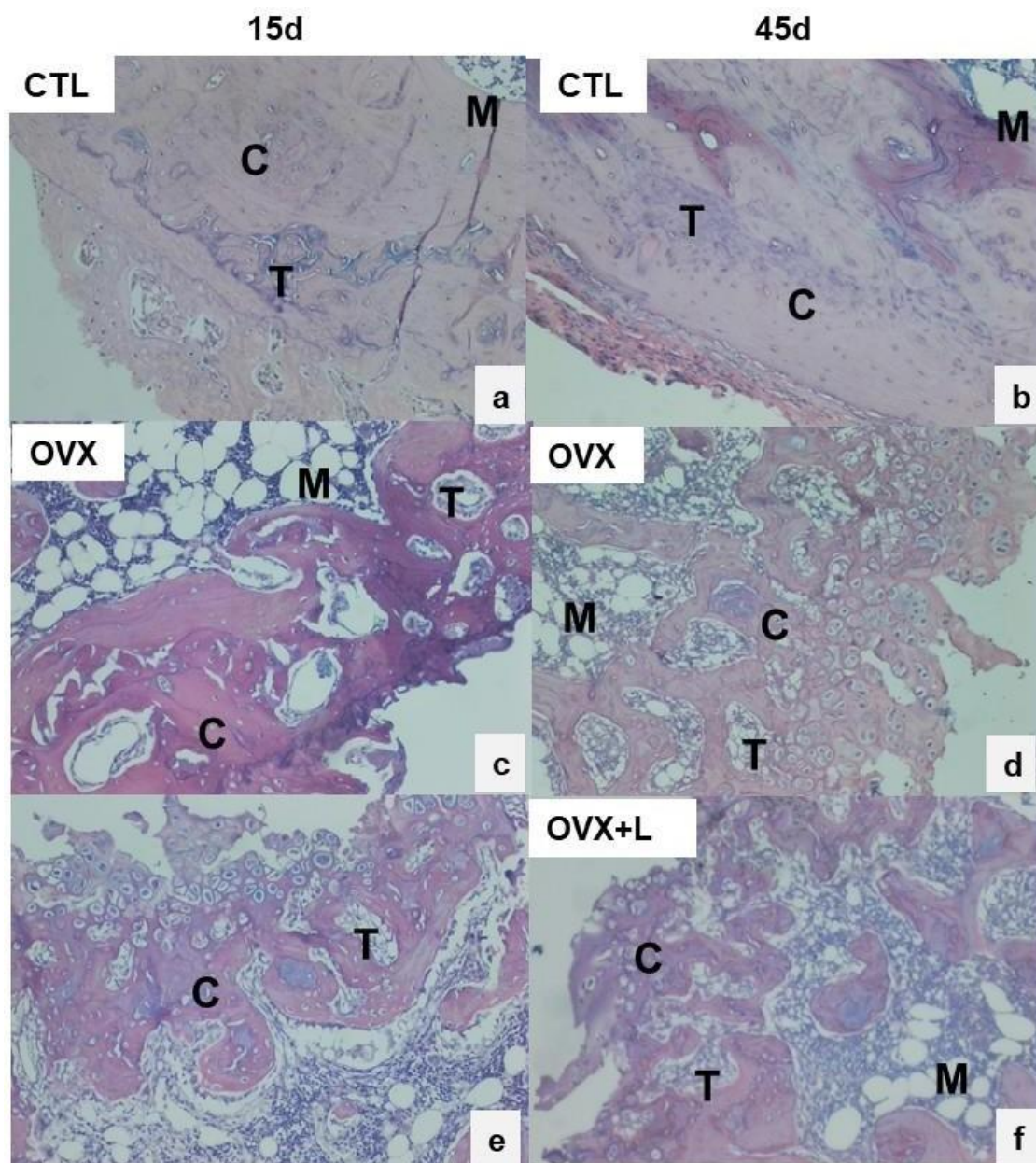
A análise de variância mostrou ausência de diferenças significantes entre os grupos estudado para ambos os tempos de análise ($p = 0,3343$ e $p = 0,7002$ para 15 dias e 45 dias, respectivamente. ANOVA)

A comparação entre os tempos (15 dias x 45 dias) estudados mostrou indícios de diferença significativa para todos os grupos estudados ($p = 0.0056$, $p < 0.0001$ e $p = 0,0013$ para os grupos C, OVX e OVX+L, respectivamente, teste t)

4.5. Análise morfológica – histologia

A Figura 22 abaixo representa um quadro comparativo das lâminas histológicas coradas em HE, em aumento 100X, nos diferentes grupos e tempos.

Figura 22 Quadro comparativo das fotomicrografias obtidas no aumento de 100x. a, b) CTL (grupo controle) 15 e 45 d, c, d) OVX (grupo ovariectomia com cirurgia convencional) 15 e 45 d, e, f) OVX+L (grupo ovariectomia e cirurgia com lasers) 15 e 45 d. C (cortical), M (medular) e T (tecido ósseo de transição)



Fonte: autora

A análise histológica realizada nos cortes ósseos revelou diferenças qualitativas distintas entre os grupos C, OVX e OVX+L, avaliadas nos períodos de 15 e 45 dias de cicatrização. Foram examinadas a camada cortical (C), a medular (M) e o tecido de transição (T) na região correspondente ao preparo do leito ósseo para instalação dos implantes.

No grupo C, aos 15 dias, observou-se uma camada cortical íntegra e espessa, com matriz óssea organizada e densamente mineralizada. A região de transição apresentou padrão trabecular inicial, evidenciando remodelação fisiológica, enquanto o tecido medular manteve-se com espaços preservados e presença de células hematopoiéticas. Aos 45 dias, a cortical continuou espessa, com sinais de maturação avançada; o tecido de transição tornou-se mais organizado e menos celular, e a medular permaneceu com morfologia normal.

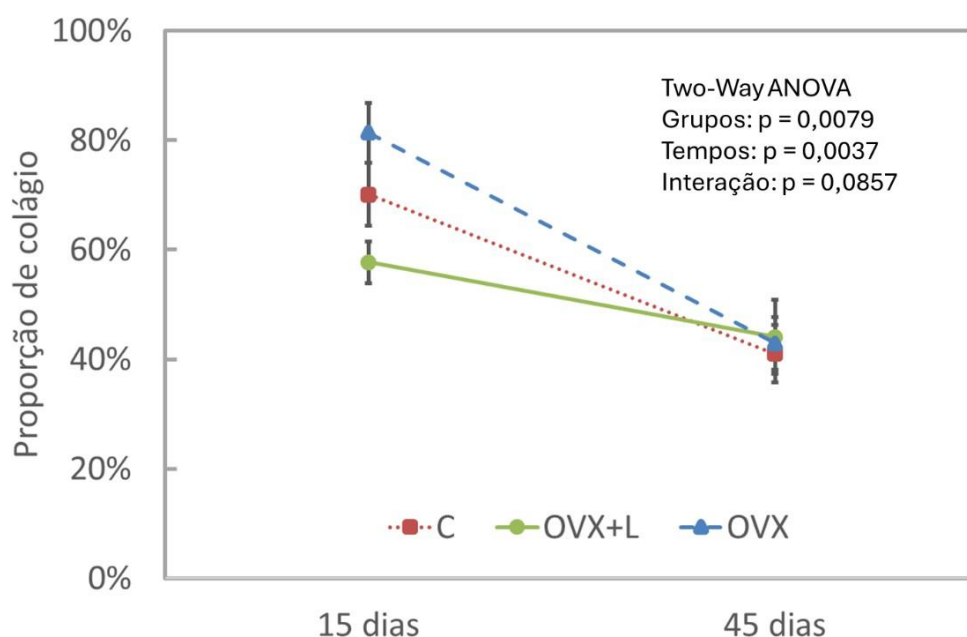
No grupo OVX, aos 15 dias, a cortical apresentou-se mais fina e irregular, com trabéculas desorganizadas e porosidade aumentada. O tecido de transição revelou baixa definição entre compartimentos e presença de tecido frouxo, rarefeito e com menor densidade celular e óssea. A medular apresentou expansão com predomínio de tecido adiposo. Aos 45 dias, persistiram a porosidade e a redução da espessura cortical, além de uma região de transição desorganizada e mal delimitada. O tecido medular manteve o padrão de adiposidade, indicando atraso no processo de remodelação.

No grupo OVX+L, aos 15 dias, a cortical apresentou organização semelhante à do grupo OVX, com trabéculas irregulares e aspecto imaturo. O tecido de transição mostrou leve aumento na densidade trabecular, embora ainda com grande variabilidade morfológica. A medular manteve o predomínio de tecido adiposo. Aos 45 dias, foi observada maior espessura da cortical e trabéculas mais organizadas, embora sem padrão homogêneo. O tecido de transição apresentou trabéculas delgadas e esparsas, sugerindo discreta atividade osteoblástica, e o tecido medular manteve a predominância de adiposidade.

4.6. Análise Colágeno Total

A Figura 23 mostra o gráfico de médias da proporção de colágeno observada nos grupos estudados.

Figura 23: Gráfico de médias da porcentagem de colágeno para os grupos estudados. As barras de erro representam os erros padrão. Fonte: autora



A análise de variância de dois fatores com medidas independentes foi conduzida para avaliar o efeito de três diferentes grupos experimentais (C, OVX e OVX+L) e dois tempos de análise (15 dias e 45 dias) sobre a variável de interesse. Os resultados revelaram um efeito principal significativo do fator grupo ($p = 0,0079$, two-way ANOVA), indicando que pelo menos um dos grupos apresentou valores médios significativamente diferentes dos demais. Da mesma forma, observou-se um efeito principal significativo do fator tempo ($p = 0,0037$, two-way ANOVA), o que demonstra que houve uma diferença estatisticamente relevante entre os valores médios obtidos nos tempos de 15 e 45 dias.

Por outro lado, a interação entre grupo e tempo não foi estatisticamente significativa ($p = 0,0857$, two-way ANOVA). Isso sugere que o padrão de variação dos grupos ao longo do tempo é semelhante, ou seja, a diferença entre os tempos se comporta de forma consistente entre os grupos.

A análise *post-hoc* foi realizada separadamente para os tempos de 15 e 45 dias, a fim de identificar diferenças específicas entre os grupos experimentais em cada ponto temporal.

Aos 15 dias, observou-se que o grupo OVX apresentou valores significativamente maiores que o grupo OVX+L ($p = 0,0010$, Tukey), e o grupo controle (C) também apresentou valores superiores ao grupo OVX+L ($p = 0,019$).

No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos C e OVX ($p = 0,1350$. Tukey). Esses resultados indicam que, no tempo mais precoce, a supressão ovariana isolada (OVX) resulta em um aumento significativo da variável estudada em comparação ao grupo que recebeu tratamento (OVX+L), enquanto o grupo controle se posiciona de forma intermediária, estatisticamente semelhante ao OVX.

Aos 45 dias, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,24$ em todas as comparações. Tukey). A ausência de diferenças neste tempo indica que as alterações observadas aos 15 dias se atenuaram com o passar do tempo, resultando em uma homogeneização dos valores médios entre os grupos na fase mais tardia.

Em conjunto, esses achados sugerem que as intervenções experimentais influenciam significativamente a variável de interesse em um estágio inicial (15 dias), especialmente no que diz respeito à comparação com o grupo tratado (OVX+L). Contudo, essas diferenças não se mantêm ao longo do tempo, indicando uma possível adaptação fisiológica ou reversão dos efeitos iniciais após 45 dias.

5. DISCUSSÃO

A osseointegração de implantes em ossos de baixa qualidade representa uma preocupação clínica relevante, sobretudo em populações com alterações sistêmicas do metabolismo ósseo^{8,9}. Diante desse desafio, investigou-se neste estudo a aplicação combinada dos lasers Er:YAG no preparo do leito ósseo para instalação de implantes de titânio e Nd:YAG para fotobiomodulação, com avaliação de desfechos biomecânicos, morfológicos e bioquímicos, em modelo experimental de osteopenia. Os resultados deste estudo demonstram que a condição osteopênica induzida por ovariectomia compromete a osseointegração de implantes dentários, afetando a resistência biomecânica, a maturação do colágeno e a qualidade histológica do osso neformado.

Aos 15 dias, a resistência ao deslocamento vertical dos implantes (*Stress*) apresentou ausência de diferenças estatísticas entre os grupos, o que é compatível com a fase inicial da osseointegração, caracterizada pela predominância de tecido ósseo imaturo²⁵. Os dados obtidos no teste *push-in* demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ovariectomizados (OVX e OVX+L), embora o grupo OVX+L tenha apresentado valores médios discretamente superiores. Aos 45 dias, o grupo C apresentou desempenho biomecânico significativamente superior, confirmando a influência da qualidade óssea na estabilidade do implante.

A ausência de significância nos valores de *Strain* entre grupos e tempos avaliados, indica que as propriedades elásticas do osso regenerado se mantiveram estáveis ao longo do tempo, independentemente da técnica utilizada ou da condição sistêmica. Este dado sugere que o componente deformacional do tecido não foi afetado pela intervenção a laser ou pela osteopenia.

A literatura atual é controversa com relação aos benefícios do uso de laser Er:YAG para perfuração óssea de leitos para instalação de implantes, em termos de resistência biomecânica final. Tretto *et al.*⁴² (2019) e Ohsugi *et al.*⁴⁰ (2019), discutem as limitações do preparo com laser Er:YAG quanto à ausência de padronização da geometria da osteotomia e à baixa previsibilidade na obtenção de estabilidade primária do implante. Os autores afirmam que estes fatores podem comprometer a adaptação óssea inicial e repercutir negativamente nos

resultados biomecânicos. Entretanto, Semez *et al.* (2021)⁵⁷ utilizaram o laser Er:YAG e observaram maior presença de osso lamelar maduro, menor necrose e melhor contato osso-implante, sugerindo vantagens para protocolos de carga imediata. Apesar de reconhecerem os desafios operacionais envolvidos, concluíram que o preparo com laser foi superior à fresagem convencional o que vai de encontro aos nossos achados onde o preparo com o laser não mostrou diferença significativa em relação ao preparo convencional nas análises de *stress* e *strain* em ratas com osteopenia.

Uma das limitações do presente estudo foi a não inclusão de um grupo com uso isolado do Er:YAG, uma vez que a literatura já aponta que: apesar de seus efeitos benéficos iniciais sobre a superfície óssea e o microambiente local, o seu uso isolado não apresenta superioridade consistente em relação à fresagem convencional em termos de osseointegração a médio e longo prazo. Em contrapartida os estudos de Zhao *et al.* (2022)²⁴ e Neto *et al.* (2025)⁶⁰ demonstraram que a combinação dos lasers de Er:YAG e Nd:YAG potencializou a expressão de genes osteogênicos e favoreceu a estabilidade secundária dos implantes.

Os achados histológicos não evidenciaram diferenças estruturais marcantes entre os grupos OVX e OVX+L em nenhum tempo avaliado. Ambas as condições osteopênicas apresentaram trabéculas ósseas esparsas e desorganizadas, medula óssea predominantemente adiposa e padrão cortical comprometido. Embora o grupo OVX+L tenha exibido, pontualmente, áreas com leve aumento na densidade trabecular e organização da zona de transição aos 45 dias, essas alterações não configuraram uma melhoria morfológica consistente ou suficientemente distinta para afirmar um benefício histológico expressivo em comparação ao grupo OVX. Esses dados sugerem que a intervenção com o uso dos lasers, tal como aplicada neste protocolo, não foi capaz de reverter substancialmente os efeitos deletérios da osteopenia no microambiente ósseo peri-implantar²⁹.

A porcentagem de colágeno total foi a única variável a apresentar diferença estatisticamente significativa, mostrando-se menor no grupo OVX+L em relação ao grupo OVX, especialmente aos 15 dias. Esse achado sugere que o uso combinado dos lasers promoveu uma estimulação positiva na fase inicial da regeneração óssea, favorecendo a mineralização da matriz orgânica. Esse

resultado é consistente com evidências pré-clínicas que demonstram estimulação mitocondrial e aumento da atividade enzimática após a utilização da FBM^{55,53}.

Essa diminuição inicial na quantidade de colágeno não foi acompanhada por uma elevação estatisticamente significativa da fosfatase alcalina sérica. A ausência de significância nos níveis de FA pode indicar que, embora a maturação da matriz orgânica tenha sido favorecida, a mineralização subsequente ainda não havia atingido seu pico nos tempos analisados, ou que a resposta bioquímica sistêmica permaneceu limitada.

A análise da FA, marcador bioquímico de atividade osteoblástica, não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, tanto aos 15 quanto aos 45 dias. Embora o grupo OVX+L tenha apresentado médias numericamente superiores ao grupo OVX aos 15 dias, esses resultados não permitem inferir efeito bioquímico relevante da intervenção com base estatística robusta. Considerando a natureza transitória da expressão da FA e a limitação de pontos temporais de coleta, recomenda-se que estudos futuros adotem intervalos mais curtos para melhor capturar variações dinâmicas na atividade osteogênica. Adicionalmente, todos os grupos apresentaram queda significativa nos níveis de FA aos 45 dias, compatível com a progressão fisiológica da osseointegração para a fase de remodelação óssea e mineralização. Em comparação, Neto *et al.*⁶⁰ (2025), utilizaram RT-PCR para mensurar a expressão local do gene ALP no tecido peri-implantar, observando aumento significativo nos grupos submetidos ao preparo com laser Er:YAG, isolado ou associado à fotobiomodulação. A divergência entre os achados pode ser atribuída à diferença metodológica: enquanto a análise molecular detecta alterações localizadas no microambiente ósseo, a dosagem sérica reflete um padrão sistêmico menos sensível a efeitos pontuais. Esses dados sugerem que os efeitos do laser podem ocorrer de forma restrita ao leito cirúrgico, sem repercussão mensurável nos níveis circulantes da enzima.

As divergências de resultados com o presente estudo com a literatura atual, pode ser atribuída a diferenças metodológicas importantes, como o modelo experimental com ratas ovariectomizadas, forma de utilização do laser de Er:YAG como assistente cirúrgico ou como protagonista no preparo, tipo de implante utilizado (usinagem versus manufatura aditiva), e o método de

avaliação biomecânica (*push-in* versus torque de remoção). Os estudos, no entanto, convergem ao indicar que o uso combinado dos lasers pode favorecer a biocompatibilidade inicial e a ativação celular.

A ausência de significância estatística nos parâmetros biomecânicos e o comportamento discreto da fosfatase alcalina evidenciam que o processo de mineralização da matriz de colágeno ainda não se consolidou funcionalmente nos tempos avaliados. A osteopenia induzida compromete a atividade osteoblástica e reduz a densidade mineral óssea, dificultando a maturação e a mineralização da matriz formada, o que sugere que o uso do laser foi incapaz de contrapor os efeitos deletérios oriundos da condição osteopênica das ratas.

Além das limitações técnicas já mencionadas sobre o preparo com Er:YAG, é importante destacar o alto custo operacional da associação dos dois sistemas laser, o que limita sua viabilidade na prática clínica rotineira. Como alternativa mais acessível, o uso de lasers de diodo para FBM tem se mostrado promissor em diversos estudos, apresentando parâmetros eficazes, menor custo e maior disponibilidade no contexto clínico-odontológico. A escolha do laser Nd:YAG para aplicação da FBM neste estudo foi motivada não apenas por seu potencial terapêutico documentado, mas também por uma decisão metodológica: o Nd:YAG está incorporado ao mesmo equipamento (Fotona LightWalker®) utilizado para a osteotomia com Er:YAG, viabilizando a realização de ambos os procedimentos com uma única plataforma integrada, sem necessidade de troca de dispositivos ou alteração logística entre as fases da cirurgia.

Além disso, estudos prévios sugerem que, quando utilizados com parâmetros adequados de baixa potência, os lasers Nd:YAG podem promover efeitos bioestimuladores comparáveis aos lasers de diodo tradicionais, com destaque para sua maior profundidade de penetração tecidual e potencial de ativação mitocondrial profunda^{54,55,53}. Portanto, a adoção do Nd:YAG para FBM neste protocolo representa não apenas uma escolha conveniente em situações em que estão disponíveis plataformas laser de múltiplos comprimentos de onda.

5.1. Limitações da pesquisa

É importante ressaltar que a literatura carece de dados utilizando um modelo experimental de ratas ovariectomizadas para estudo de implantes com preparo a laser, o que dificulta a otimização da escolha dos parâmetros radiométricos a serem adotados. Ademais, em se tratando do preparo de uma cavidade de dimensões diminutas (no modelo adotado), a baixa precisão obtida pela ablação a laser pode impactar significativamente os resultados finais.

O custo elevado da utilização do laser também limitou os grupos experimentais e as variações de parâmetros de laser utilizadas neste estudo.

Futuros estudos com maior poder amostral, avaliação histomorfométrica quantitativa e otimização dos parâmetros dos lasers poderão oferecer esclarecimentos mais robustos quanto ao real impacto desta abordagem combinada na osseointegração, especialmente em condições clínicas desafiadoras.

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a associação dos lasers Er:YAG e Nd:YAG promoveu estímulo precoce à formação de tecido ósseo em modelo experimental de osteopenia, sugerindo potencial benefício no reparo ósseo peiimplantar. No entanto, esse efeito biológico não se traduziu em diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros biomecânicos ou na atividade de fosfatase alcalina, indicando que a maturação funcional do tecido ósseo não foi consolidada nos períodos avaliados.

Limitações como o custo elevado, a complexidade técnica e a falta de padronização do preparo com laser ainda restringem a aplicação rotineira desta combinação de lasers na implantodontia. Assim, os achados reforçam o potencial da terapia combinada, mas indicam a necessidade de novos estudos com maior poder amostral, tempos de acompanhamento mais longos e protocolos clínicos validados.

7. TRABALHOS FUTUROS

Futuros estudos devem explorar a aplicação combinada dos lasers Er:YAG e Nd:YAG em diferentes janelas temporais e com parâmetros dosimétricos otimizados, a fim de esclarecer seu impacto sobre as fases sequenciais da osseointegração, especialmente em modelos de osso de baixa densidade. Além disso, a inclusão de grupos experimentais adicionais — como o uso do laser Er:YAG e de fresas convencionais associados fotobiomodulação com diferentes fontes, como lasers de diodo — poderá permitir a distinção mais precisa dos efeitos dessas intervenções. Avaliações complementares, como análises histomorfométricas quantitativas, expressão gênica local de marcadores osteoblásticos e acompanhamento em períodos mais longos, também são recomendadas para validar a aplicabilidade clínica desta abordagem em protocolos de carga precoce ou imediata.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Luiz Carlos Uchoa Junqueira; José Carneiro. Histologia Básica. Texto e Atlas [Internet]. 14th ed. Rio de Janeiro; 2023. Available from: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788527739283/epubcfi/6/8%5B%3Bvnd.vst.idref%3Dtitle%5D!/4/2/6%4051:88>
- 2 Brasil. Ministério de Saúde. Secretaria de Ciência Tecnologia Inovação e Complexo da Saúde. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em Saúde. Coordenação Geral de Avaliação de Tecnologias em Saúde - CGATS. Relatório de recomendação: osteoporose. Versão preliminar. 2022;1–99. Available from: <https://www.gov.br/conitec/pt-br>
- 3 Alghamdi HS, Van Den Beucken JJJP, Jansen JA. Osteoporotic rat models for evaluation of osseointegration of bone implants. *Tissue Eng - Part C Methods*. 2014;20(6):493–505.
- 4 Salari N, Ghasemi H, Mohammadi L, Behzadi M hasan, Rabieenia E, Shohaimi S., *et al.* The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res* [Internet]. 2021;16(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s13018-021-02772-0>
- 5 Pinheiro MM, Ciconelli RM, Martini LA, Ferraz MB. Clinical risk factors for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Osteoporos Int*. 2009;20(3):399–408.
- 6 Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S., *et al.* Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2014;25(10):2359–81.
- 7 Scheibel PC, Matheus PD, Albino CC, Ramos AL. Correlação entre a densidade óssea mandibular, femural, lombar e cervical. *Rev Dent Press Ortod e Ortop Facial*. 2009;14(4):111–22.
- 8 de Medeiros FCFL, Kudo GAH, Leme BG, Saraiva PP, Verri FR, Honório HM, *et al.* Dental implants in patients with osteoporosis: a systematic review with meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2018;47(4):480–91.
- 9 Giro G, Chambrone L, Goldstein A, Rodrigues JA, Zenóbio E, Feres M, *et al.* Impact of osteoporosis in dental implants: A systematic review. *World J Orthop*. 2015;6(2):311–5.
- 10 Zeitouni J, Clough B, Zeitouni S, Saleem M, Al Aisami K, Gregory C. The effects of the Er laser on trabecular bone micro-architecture: comparison with conventional dental drilling by micro-computed tomographic and histological techniques. *F1000Res*. 2017 Jul 17;6:1133. doi:10.12688/f1000research.12018.1.

11 Walsh JT Jr, Flotte TJ, Deutsch TF. Er:YAG laser ablation of tissue: effect of pulse duration and tissue type on thermal damage. *Lasers Surg Med*. 1989;9(4):314-26. doi: 10.1002/lsm.1900090403. PMID: 2761327.

12 Akyol UK, Güngörmüş M, Gündoğdu C, Erdem H. Histologic evaluation of the effects of Er:YAG laser on bone ablation. *J Contemp Dent Pract*. 2009 Sep 1;10(5):E065-72. PMID:19838612.

13 Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol* 2000. 2004;36(5):59–97.

14 Aoki A, Mizutani K, Taniguchi Y, Lin T, Ohsugi Y, Mikami R, et al. Current status of Er:YAG laser in periodontal surgery. *Jpn Dent Sci Rev* [Internet]. 2024;60(November 2023):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2023.11.002>

15 Kulkarni S, Meer M, George R. Efficacy of photobiomodulation on accelerating bone healing after tooth extraction: a systematic review. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2019 Jun 11;34(4):685–92. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-018-2641-3>

16 Križaj Dumić A, Pajk F, Olivi G. The effect of post-extraction socket preservation laser treatment on bone density 4 months after extraction: Randomized controlled trial. *Clin Implant Dent Relat Res* [Internet]. 2021 Jun 8;23(3):309–16. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cid.12991>

17 Fragkioudakis I, Kallis A, Kesidou E, Damianidou O, Sakellari D, Vouros I. Surgical Treatment of Peri-Implantitis Using a Combined Nd: YAG and Er: YAG Laser Approach: Investigation of Clinical and Bone Loss Biomarkers. *Dent J (Basel)*. 2023 Feb 24;11(3):61.doi: 10.3390/dj11030061. PMID: 36975558; PMCID: PMC10046921.

18 Vescovi P, De Francesco P, Giovannacci I, Leão JC, Barone A. Piezoelectric Surgery, Er:YAG Laser Surgery and Nd:YAG Laser Photobiomodulation: A Combined Approach to Treat Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws (MRONJ). *Dent J* [Internet]. 2024 Aug 19;12(8):261. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-6767/12/8/261>

19 Mei Z, Hu H, Zou Y, Li D. The role of vitamin D in menopausal women's health. *Front Physiol*. 2023;14(June):1–7.

20 Elahmer NR, Wong SK, Mohamed N, Alias E, Chin KY, Muhammad N. Mechanistic Insights and Therapeutic Strategies in Osteoporosis: A Comprehensive Review. *Biomedicines*. 2024;12(8).

21 Martin TJ, Seeman E. Bone Remodeling and Modeling: Cellular Targets for Antiresorptive and Anabolic Treatments, Including Approaches Through the Parathyroid Hormone (PTH)/PTH-Related Protein Pathway. *Neurospine*. 2023;20(4):1097–109.

-
- 22 VIEIRA, J.G.H. Considerações Sobre os Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo e sua Utilidade Prática. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.43, n.6, p. 416-422, 1999.
- 23 SILVERTHORN DU. *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. 2017.
- 24 Zhao B, Li X, Xu H, Jiang Y, Wang D, Liu R. Influence of Simvastatin-Strontium-Hydroxyapatite Coated Implant Formed by Micro-Arc Oxidation and Immersion Method on Osteointegration in Osteoporotic Rabbits. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2020 Mar;Volume 15:1797–807. Available from: <https://www.dovepress.com/influence-of-simvastatin-strontium-hydroxyapatite-coated-implant-forme-peer-reviewed-article-IJN>
- 25 Duyck J, Vandamme K. The effect of loading on peri-implant bone: a critical review of the literature. *J Oral Rehabil*. 2014;41(10):783–94.
- 26 Guglielmotti MB, Olmedo DG, Cabrini RL. Research on implants and osseointegration. *Periodontol 2000*. 2019;79(1):178–89.
- 27 Tur D, Giannis K, Unger E, Mittlböck M, Rausch-Fan X, Strbac GD. Thermal effects of various drill materials during implant site preparation-Ceramic vs. stainless steel drills: A comparative in vitro study in a standardised bovine bone model. *Clin Oral Implants Res*. 2021 Feb;32(2):154-166. doi: 10.1111/clr.13685. Epub 2020 Dec 22. PMID: 33220104; PMCID: PMC7898889.
- 28 Pandey C, Rokaya D, Bhattarai BP. Contemporary Concepts in Osseointegration of Dental Implants: A Review. *Biomed Res Int*. 2022;2022.
- 29 Chen X, Moriyama Y, Takemura Y, Rokuta M, Ayukawa Y. Influence of osteoporosis and mechanical loading on bone around osseointegrated dental implants: A rodent study. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2021;123(June):104771. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2021.104771>
- 30 Takahashi T, Watanabe T, Nakada H, Tanimoto Y, Kimoto S, Mijares DQ, et al. Effect of a dietary supplement on peri-implant bone strength in a rat model of osteoporosis. *J Prosthodont Res* [Internet]. 2016 Apr;60(2):131–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1883195815001139>
- 31 Radi IA, Ibrahim W, Iskandar SMS. Prognosis of dental implants in patients with low bone density : A systematic review and meta-analysis. *J Prosthet Dent* [Internet]. 2018 May;120(5):668–77. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2018.01.019>
- 32 Akyol UK, Güngörmüş M, Gündoğdu C, Erdem H. Histologic evaluation of the effects of Er:YAG laser on bone ablation. *J Contemp Dent Pract*. 2009;10(5):69–75.
- 33 Lewandrowski KU, Lorente C, Schomacker KT, Flotte TJ, Wilkes JW, Deutsch TF. Use of the Er:YAG laser for improved plating in maxillofacial surgery:

Comparison of bone healing in laser and drill osteotomies. *Lasers Surg Med.* 1996;19(1):40–5.

34 Safioti LM, Kotsakis GA, Pozhitkov AE, Chung WO, Daubert DM. Increased Levels of Dissolved Titanium Are Associated With Peri-Implantitis – A Cross-Sectional Study. *J Periodontol* [Internet]. 2017 May;88(5):436–42. Available from: <https://aap.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1902/jop.2016.160524>

35 Nejsem Wakim R, Namour M, Nguyen H, Peremans A, Zeinoun T, Vanheusden A, et al. Decontamination of Dental Implant Surfaces by the Er:YAG Laser Beam: A Comparative in Vitro Study of Various Protocols. *Dent J* [Internet]. 2018 Dec 1;6(4):66. Available from: <http://www.mdpi.com/2304-6767/6/4/66>

36 Kesler, G., Romanos, G., and Koren R. Use of Er:YAG Laser to Improve Osseointegration of Titanium Alloy Implants-Aa Comparison of Bone Healing. *J Prosthet Dent.* 2006;97(5):314

37 Schwarz F, Olivier W, Hertzen M, Sager M, Chaker A, Becker J. Influence of implant bed preparation using an Er:YAG laser on the osseointegration of titanium implants: A histomorphometrical study in dogs. *J Oral Rehabil.* 2007;34(4):273–81

38 Kanazirski N, Vladova D, Neychev D, Raycheva R, Kanazirska P. Effect of Er:YAG Laser Exposure on the Amorphous Smear Layer in the Marginal Zone of the Osteotomy Site for Placement of Dental Screw Implants: A Histomorphological Study. *J Funct Biomater.* 2023;14(7).

39 Romanos GE, Motwani S V., Montanaro NJ, Javed F, Delgado-Ruiz R. Photothermal Effects of Defocused Initiated Versus Noninitiated Diode Implant Irradiation. *Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surg* [Internet]. 2019 Jun;37(6):356–61. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/photob.2018.4545>

40 Yujin Ohsugi, Akira Aoki¹, Koji Mizutani, Sayaka Katagiri, Motohiro Komaki¹, Masahiro Noda T, Takagi, Sho Kakizaki, Walter Meinzer YI. Evaluation of bone healing following Er:YAG laser ablation in rat calvaria compared with bur drilling. *J Biophotonics.* 2019;12(3).

41 Pandurić DG, Bago I, Katanec D, Žabkar J, Miletić I, Anić I. Comparison of Er:YAG Laser and surgical drill for osteotomy in oral surgery: An experimental study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70(11):2515–21.

42 Tretto PHW, Fabris V, Cericato GO, Sarkis-Onofre R, Bacchi A. Does the instrument used for the implant site preparation influence the bone–implant interface? A systematic review of clinical and animal studies. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2019;48(1):97–107. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2018.04.005>

43 Mordon S, Brisot D, Fournier N. Using a “non uniform pulse sequence” can improve selective coagulation with a Nd:YAG laser (1.06 μm) thanks to Met-hemoglobin absorption: A clinical study on blue leg veins. *Lasers Surg Med*

[Internet]. 2003 Feb;32(2):160–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lsm.10135>

44 Evrard VAC, Deprest JA, Van Ballaer P, Lerut TE, Vandenberghe K, Brosens IA. Underwater Nd:YAG Laser Coagulation of Blood Vessels in a Rat Model. *Fetal Diagn Ther* [Internet]. 1996;11(6):422–6. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/264359>

45 Karoussis IK, Kyriakidou K, Psarros C, Lang NP, Vrotsos IA. Nd:YAG laser radiation (1.064 nm) accelerates differentiation of osteoblasts to osteocytes on smooth and rough titanium surfaces in vitro. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2017 Jul 8;28(7):785–90. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/clr.12882>

46 Li Q, Chen Y, Dong S, Liu S, Zhang X, Si X, et al. Laser irradiation promotes the proliferation of mouse pre-osteoblast cell line MC3T3-E1 through hedgehog signaling pathway. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2017 Sep 1;32(7):1489–96. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-017-2269-8>

47 Mellado-Valero A, Buitrago-Vera P, Sola-Ruiz M, Ferrer-Garcia J. Decontamination of dental implant surface in peri-implantitis treatment: A literature review. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal* [Internet]. 2013;e869–76. Available from: http://www.medicinaoral.com/pubmed/medoralv18_i6_p869.pdf

48 Karu, T., 1999. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* 49, 1-17.

49 Ribeiro, M.S., Teixeira da Silva, D.F., Maldonado, E.P., de Rossi, W., Zezell, D.M., 2002. Effects of 1047-nm Neodymium laser radiation on skin wound healing. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 20(1), 37-40.

50 Basford, J.R., Sheffield, C.G., Hermesen, W.S.D., 1999. Laser therapy: a randomized, controlled trial of the effects of low-intensity Nd:YAG laser irradiation on musculoskeletal back pain. *Arch.Phys. Med. Rehabil.* 80, 647-652

51 Sezer, U., Eltas, A., Ustün, K., Senyurt, S.Z., Erciyas, K., Aras, M.H., 2012. Effects of low-level laser therapy as an adjunct to standard therapy in acute pericoronitis, and its impact on oral healthrelated quality of life. *Photomed. Laser Surg.* 30(10):592-597.

52 Usumez, A., Cengiz, B., Oztuzcu, S., Demir, T., Aras, M.H., Gutknecht, N., 2014. Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980, and 1,064) on mucositis in an animal model of wound healing. *Lasers Med. Sci.* 29, 1807-1813.

53 Zhang H, Zhang C, Pan L, Chen Y, Bian Z, Yang Y, et al. Low-level Nd:YAG laser inhibiting inflammation and oxidative stress in human gingival fibroblasts via AMPK/SIRT3 axis. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2024 Feb;251:112845. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134424000058>

54 Amaroli A, Benedicenti A, Ravera S, Parker S, Selting W, Panfoli I, et al. Short-pulse neodymium:yttrium–aluminium garnet (Nd:YAG 1064 nm) laser irradiation photobiomodulates mitochondria activity and cellular multiplication of *Paramecium primaurelia* (Protozoa). *Eur J Protistol* [Internet]. 2017;61:294–304. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejop.2017.06.003>

55 Saini RS, Ahmed M, Okshah A, Ali A, Alshadidi F, Ibrahim R, et al. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Comparative efficacy of photobiomodulation on osseointegration in dental implants : A systematic review and meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2024;48(May):104256. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2024.104256>

56 Križaj Dumić A, Pajk F, Olivi G. The effect of post-extraction socket preservation laser treatment on bone density 4 months after extraction: Randomized controlled trial. *Clin Implant Dent Relat Res* [Internet]. 2021 Jun 8;23(3):309–16. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cid.12991>

57 Semez G, Cescato A, Luca RE, Tonetti L, Todea DC. A Comparative Analysis Regarding the Osseointegration of Immediate Loaded Implants Using Two Different Implant Site Preparations: Erbium:Yttrium-Aluminum-Garnet Laser Versus Surgical Conventional Way - An in Vivo and Histological Animal Study. *Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surg*. 2021;39(1):70–80.

58 Tianyuan Zhao and Meihua Li. Combined Application of Er:YAG and Nd:YAG Lasers Enhances Osseointegration at Dental Bone-Implant Interface. *Front Mater*. 2022;9(828838):1–10.

59 Vescovi P, De Francesco P, Giovannacci I, Leão JC, Barone A. Piezoelectric Surgery, Er:YAG Laser Surgery and Nd:YAG Laser Photobiomodulation: A Combined Approach to Treat Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws (MRONJ). *Dent J* [Internet]. 2024 Aug 19;12(8):261. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-6767/12/8/261>

60 Neto FC, Breseghello I, Paludetto LV, Cruz S, Frasnelli T, Batista RDS, et al. Effect of Er:YAG laser bone bed milling, with or without photobiomodulation, on the bone repair process of additive manufacturing implants in rats. *J Photochem Photobiol* [Internet]. 2025;100260. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpap.2025.100260>

61 Pinotti FE, Aroni MAT, Oliveira GJPL de, Silva BLG, Marcantonio Junior E, Marcantonio RAC. Osseointegration of implants with superhydrophilic surfaces in rats with high serum levels of nicotine. *Braz Dent J* [Internet]. 2023 Mar;34(2):105–12. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-64402023000200105&tlng=en

-
- 62 Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, Ghasemi A. Ovariectomized rat model of osteoporosis: A practical guide. *EXCLI J*. 2020;19:89–107.
- 63 Sculean GER& NG& SD& FS& RC& A, Received: Laser wavelengths and oral implantology. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2009;24:961–70. Available from: <https://doi.org/10.2147/ccide.s12160347>
- 64 Olson ME, Bruce J, In ATN. Ovariohysterectomy and Orchidectomy in Rodents and Rabbits. 1986;27(12).
- 65 Romero TF, Gipsis I, Román S, Clapés Hernández S. Protocolo para la citología vaginal directa de ratas de laboratorio Protocol for direct vaginal cytology of laboratory rats. *Rev Habanera Ciencias Médicas* [Internet]. 2021;20(3):1–7. Available from: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/4086>
- 66 Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse. *Toxicol Pathol* [Internet]. 2015 Aug 3;43(6):776–93. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623315570339>
- 67 Stübinger S, Biermeier K, Bächli B, Ferguson SJ, Sader R, Von Rechenberg B. Comparison of Er:YAG laser, piezoelectric, and drill osteotomy for dental implant site preparation: A biomechanical and histological analysis in sheep. *Lasers Surg Med*. 2010;42(7):652–61.
- 68 Ogawa T, Ozawa S, Shih JH et al. Avaliação biomecânica de implantes ósseos com diferentes topografias de superfície em ratos. *Journal of Dental Research* . 2000;79(11):1857-1863. doi: 10.1177/0022034500079011070
- 69 Kono M, Aita H, Ichioka Y, Kado T, Endo K, Koshino H. NaOCL-mediated biofunctionalization enhances bone-titanium integration. *Dent Mater J*. 2015;34(4):537–44.
- 70 Han JM, Hong G, Lin H, Shimizu Y, Wu Y, Zheng G, et al. Biomechanical and histological evaluation of the osseointegration capacity of two types of
- 71 Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY. Executive summary of the European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int*. 2019;104(3):235–8.
- 72 MCcomb, RB, Bowers, GNU. 4-nitrophenyl phosphate--characterization of high-purity materials for measuring alkaline phosphatase activity in human serum. *A Clin Chem*. 1981;27(1):135–41.
- 73 Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2013 Jan 1;28(1):2–17. Available from: <https://academic.oup.com/jbmr/article/28/1/2-17/7598790>

ANEXO A – Certificado de aprovação do projeto de pesquisa emitido pelo Ceua da Uninove



Universidade Nove de Julho
Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do uso combinado de laser Nd:YAG e Er:YAG como adjuvantes na preparação de locais ósseos de implantes dentários em *Rattus norvegicus* (Rodentia □ Muridae) (Rato Wistar) com osteoporose induzida.", protocolada sob o CEUA nº 6054240624 (ID 000431), sob a responsabilidade de **Alessandro Melo Deana e equipe; Luciana Toledo Costa Salviatto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 26/06/2024.

We certify that the proposal "Evaluation of the combined use of Nd:YAG and Er:YAG lasers as adjuvants in the preparation of bone sites for dental implants in *Rattus norvegicus* (Rodentia □ Muridae) (Wistar Rat) with induced osteoporosis.", utilizing 32 Heterogenics rats (32 females), protocol number CEUA 6054240624 (ID 000431), under the responsibility of **Alessandro Melo Deana and team; Luciana Toledo Costa Salviatto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 06/26/2024.

Finalidade da Proposta: *Pesquisa (Acadêmica)*

Vigência da Proposta: de 07/2024 a 03/2025 Área: *Biofotônica Aplicada Às Ciências da Saúde*

Origem: *Biotério - Unidade Vergueiro*

Espécie: *Ratos heterogênicos*

Linhagem: *Wistar*

sexo: *Fêmeas*

idade: *3 a 6 meses*

Peso: *180 a 300 g*

Quantidade: *32*

São Paulo, 27 de junho de 2024


Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho


Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho



ANEXO B - Certificado de aprovação de emenda do projeto de pesquisa emitido pelo Ceua da Uninove



Universidade Nove de Julho
**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO : EMENDA v24/09/2024

Certificamos que a EMENDA (versão de 24/09/2024) da proposta intitulada "Avaliação do uso combinado de laser Nd:YAG e Er:YAG como adjuvantes na preparação de locais ósseos de implantes dentários em Rattus norvegicus (Rodentia □ Muridae) (Rato Wistar) com osteoporose induzida.", CEUA nº 6054240624 (ID 084602), sob a responsabilidade de **Alessandro Melo Deana e equipe; Luciana Toledo Costa Salviatto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) em 22/10/2024.

Pedido apresentado à CEUA: Esta emenda visa a correção de falhas no preenchimento do formulário cometidas na submissão do projeto, a inclusão do certificado do curso de capacitação do biotério da Universidade Nove de Julho, bem como a solicitação de mais 15 animais para a formação de um grupo adicional que será o grupo sham/controle. Este não será submetido ao procedimento de ovariectomia e receberá a instalação de implantes sob condições normais de saúde. Este grupo visa diminuir o viés do trabalho. Foi realizada alteração tanto no projeto, como no formulário, incluindo o grupo controle em ambos os documentos.

Considerações da CEUA: Correção realizada. Inclusão do grupo Controle no projeto e no formulário. Projeto aprovado.

Término previsto: 03/2025

Origem: Biotério - Unidade Vergueiro

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Fêmeas

idade: 3 a 6 meses

Quantidade
solicitada: 15

Linhagem: Wistar

Peso: 180 a 300 g

ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Ratos heterogênicos	Fêmeas	47	0

São Paulo, 03 de maio de 2025

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho



ANEXO C – Manual do kit de fostatase alcalina da Labtest®

[illegible][illegible][illegible]

Disponibiliza-se medicações antineoplásicas assim como a atividade anticâncer de plantas em doses.

Antes de usar leia o prospecto, pois apresentam maior atividade antineoplásica, apresentam diferenças quanto à atividade sobre a histamina e a serotonina.

Quaisquer caso de reações, intoxicações, hipersensibilizações, desconfortos, reações cutâneas, podem ocorrer durante a utilização da atividade anticâncer de plantas.

Casos com alteração de corsting hemodinâmica apresentam a atividade anticâncer sem alteração.

Observações

1. A limpeza e conservação adequada do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade da preparação utilizada em estudos de controle.

2. Utilizar o produto com o mesmo regime de lavagem e resultados dados e positivos. A utilização de água de qualidade ultrapurada é uma característica de excelência necessária. A água destilada de qualidade afeta na obtenção de resultados satisfatórios a cada utilização. Assim, para garantir resultados, não se usa medicação e nem se muda água da solução, caso seja necessário (1) sempre com o uso de luvas e (2) armazenamento em conservação de vácuo (-0,1 mmHg). Quando a solução demonstrar cor ou sua aparência estiver alterada ou quando a água utilizada estiver com odores e sabores, não se utilizar e substituí-la por água recém produzida de qualidade de vácuo. O uso de água e substituí-la por água recém produzida de qualidade de vácuo que apresente em pacotes que não tem prazo, alterando os resultados de controle. Assim, é fundamentalmente manter um programa controlado de qualidade.

3. Como ocorre em toda medicação de atividade anticâncer, a rigidez dos resultados de teste e de fermentação de inoculação é o grande responsável na qualidade medicinal utilizada.

4. Any a sua medicação de atividade anticâncer é medicinalizada de acordo com a qualidade medicinal de qualidade anticâncer utilizada.

5. Effect of Anticancer Activity Laboratory Test, 2º edição, Washington: AACSP Press, 1995.

Referências

1. IGC Methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes Part II: GCG method for Alanine Aminotransferase (J Clin Chem Clin Biochem 1985;23:78-82).

2. McCann RL, Bower JN (J Clin Chem Clin Biochem 1987;25:135-41).

3. Melo ML, Barata CA, Duas P de Ch-Orient 1988;29:793-781.

4. Tancos DR. Quality Control in Clinical Laboratories, Warr-Cook Laboratories, Diagnostic Reagents Division, Southam, Canada, 1987.

5. Weingart J, Barry PL, Hart M, Smith D. Clin Chem 1988;37:493-505.

6. Weingart JC. Desirable Biological Variation Database Specifications (Oxford) em: <http://www.bvnet.org/www/bvdatabase/bvintro.html> (accessed on 20/02/2002).

7. Rastvan JC. Especificações da Qualidade Analítica. Laboratório de Qualidade.

8. Leites de Datas de Análise.

9. Kier ML. Games Laboratory em Medicina Veterinária, Blackwell Científica Hemática Ltda. 2005.

10. Thall MA, et al. Hematology & Clinical Chemistry Laboratory. Nova York, 2007.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
Fenitrazina 9A1	1011-4230	0212 4 g 24,0%.
Lidocaina 9A1	1011-4230	0212 4 g 4,0%.

Para informações sobre outras apresentações consulte o site www.bvnet.org/www/bvdatabase/bvintro.html ou SAC.

Informações ao consumidor

(Termos e Condições de Venda)

A Lidocaina 9A1 apresenta o conteúdo de 4 g de produto dentro da embalagem e a Fenitrazina 9A1 de 4 g de produto dentro da embalagem. Os produtos são de uso exclusivo de laboratório e não são comercializados para uso em humanos. Os produtos são de uso exclusivo de laboratório e não são comercializados para uso em humanos. Os produtos são de uso exclusivo de laboratório e não são comercializados para uso em humanos.

Lidocaina 9A1

CNPJ 10.111-4230-01 SA
Av. Paulo Renna de Castro, 630 - Vila Militar - Rio de Janeiro - RJ
Largo São Manoel - Rio de Janeiro - RJ
www.lidocaina.com.br

Registro de Saúde em Cartão: 1011-4230-01 (1º edição) 1011-4230-01 (2ª edição)

Fenitrazina 9A1

Edição Junho 2002
CNPJ 10.111-4230-01 SA
Rio de Janeiro - RJ (2ª edição)

Copyright © Fenitrazina 9A1
Apropriedade dos prazos, autorizações

04 Portugal - Ref: 1011

Ati

Labtest

ANEXO D – QUESTIONÁRIO ARRIVE

NOTE: Please save this file locally before filling in the table, DO NOT work on the file within your internet browser as changes will not be saved. Adobe Acrobat Reader (available free [here](#)) is recommended for completion.



The ARRIVE guidelines 2.0: author checklist

The ARRIVE Essential 10

These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings.

Item	Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
Study design 1	For each experiment, provide brief details of study design including:	33
	a. The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. b. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals).	33
Sample size 2	a. Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used.	34
	b. Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done.	33
Inclusion and exclusion criteria 3	a. Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established <i>a priori</i> . If no criteria were set, state this explicitly.	-
	b. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so.	-
	c. For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group.	45
Randomisation 4	a. State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence.	-
	b. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly.	33
Blinding 5	Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).	-
Outcome measures 6	a. Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes).	66
	b. For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size.	66
Statistical methods 7	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used.	32
	b. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met.	
Experimental animals 8	a. Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight.	33
	b. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures.	33
Experimental procedures 9	For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including:	35
	a. What was done, how it was done and what was used.	35
	b. When and how often.	36
	c. Where (including detail of any acclimatisation periods).	36
Results 10	d. Why (provide rationale for procedures).	36
	For each experiment conducted, including independent replications, report:	56,57,59,61
	a. Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range).	
	b. If applicable, the effect size with a confidence interval.	33