

UFBA

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde

LORENA FERRAZ SANTOS SILVA

PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



**APLICAÇÃO DA FIBRINA RICA EM
PLAQUETAS E A FOTOBIMODULAÇÃO NA
REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA: ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS**

Salvador
2024

LORENA FERRAZ SANTOS SILVA

**APLICAÇÃO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E A
FOTOBIMODULAÇÃO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA
GUIADA: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Paula Mathias de Morais Canedo

Salvador
2024

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA-SIBI, pela Bibliotecária Maria de Fátima Martinelli CRB5/551, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586 Silva, Lorena Ferraz Santos
Aplicação da fibrina rica em plaquetas e a fotobiomodulação na regeneração óssea guiada: estudo experimental em ratos/Lorena Ferraz Santos Silva. – Salvador, 2024.
61 f.: il.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Paula Mathias de Moraes Canedo.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, 2024.
Inclui referências e anexo.

1. Fibrina rica em plaquetas. 2. Laser de baixa intensidade. 3. Regeneração óssea. I. Canedo, Paula Mathias de Moraes. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.314



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Instituto de Ciências da Saúde



TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA PÚBLICA DE TESE

LORENA FERRAZ SANTOS SILVA

**APLICAÇÃO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E A FOTOBIMODULAÇÃO NA
REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Salvador Bahia, 30 de janeiro de 2024

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF. ^a DR.^a PAULA MATHIAS CANEDO (EXAMINADORA INTERNA)

PROF. ^a DR.^a LÍVIA SILVA FIGUEIREDO RIBEIRO CAPONI (EXAMINADORA EXTERNA)

PROF. DR. JORGE MOREIRA PINTO FILHO (EXAMINADOR EXTERNO)

PROF. DR. MAX JOSÉ PIMENTA LIMA (EXAMINADOR INTERNO)

PROF. DR. BRUNO BOTTO DE BARROS DE SILVEIRA (EXAMINADOR INTERNO)

Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela – Salvador/BA – CEP 40.110-100

Tel.: (71) 3283-8959 – E-mail: ppgorgsistem@ufba.br

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte de toda sabedoria e conhecimento, por sempre ter renovado minhas forças e atendido às minhas orações, estando comigo em todos os momentos, mesmo nos mais difíceis, pois era quando estava mais presente.

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, o estímulo e o empenho de diversas pessoas. Gostaria de expressar toda a minha gratidão e o apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho se tornasse uma realidade. A todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer à minha primeira orientadora, Professora Luciana Maria Pedreira Ramalho e à minha atual orientadora, Professora Paula Mathias, por terem me aceitado como sua orientanda, pelo incentivo ao meu projeto de pesquisa, o empenho e o sentido prático com que sempre me orientaram neste trabalho.

Desejo igualmente agradecer aos Professores Jorge Moreira Pinto Filho e Bruno Botto de Barros de Silveira, que embarcaram comigo em um projeto de pesquisa audacioso devido às limitações encontradas. Ambos estiveram empenhados em transmitir seus conhecimentos e sempre disponíveis para esclarecer e tirar as dúvidas que iam surgindo ao longo do caminho. Obrigada por tudo!

À Professora Tânia Tavares Rodrigues agradeço a colaboração com os seus conhecimentos veterinários e ajuda durante o manuseio com os animais.

À Professora Maria Cristina Cangussu, pelo apoio e prestatividade com que me atendeu e pelo conhecimento transmitido.

Gostaria de deixar dois agradecimentos muito especiais. Em primeiro lugar, ao Professor Robson Amaro Augusto da Silva, do Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, campus Anísio Teixeira da UFBA em Vitória da Conquista-BA, por ter me acolhido e dado viabilidade para que minha pesquisa tivesse continuidade e, em seguida, aos dois alunos que fazem parte da sua equipe: Maria Poliana Leite Galantini e Marlon Silva Nunes. Vocês evidenciaram a importância do trabalho em equipe. Minha eterna gratidão por tanto empenho e pelos ensinamentos.

Ao técnico Edilson Silva, Técnico do Laboratório de Anatomia Patológica na Faculdade de Odontologia da UFBA, por ter feito as lâminas da minha pesquisa de forma a viabilizar a obtenção dos resultados apresentados.

À Coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, pelo apoio, pelos ensinamentos e pela dedicação.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, por ter me acolhido durante esta nova etapa da minha formação.

Não menos importante, agradeço imensamente aos meus pais, à minha irmã e ao meu namorado que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

SILVA, Lorena Ferraz Santos. **Aplicação da fibrina rica em plaquetas e a fotobiomodulação na regeneração óssea guiada: estudo experimental em ratos**. 2023. Orientadora: Paula Mathias de Moraes Canedo. 61 f. il. Dissertação (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

RESUMO

Introdução: A perda óssea pode ser resultante de alguns fatores etiológicos, como traumas, lesões patológicas ou atrofia tecidual após a perda das unidades dentárias. A busca por melhorias que auxiliem ou levem ao reparo ósseo para restabelecer o padrão anatômico tem aumentado. A membrana autóloga de fibrina rica em plaquetas tem sido utilizada para auxiliar este processo de neoformação óssea, demonstrando bons resultados, assim como a laserterapia de baixa intensidade. **Objetivo:** Investigar o efeito da laserterapia de baixa intensidade ($\lambda = 830 \text{ nm}$), com o uso da citada membrana na neoformação óssea. **Metodologia:** Essa membrana foi obtida a partir de punção intracardiaca de ratos doadores. Um defeito ósseo foi criado na calvária de 48 ratos Wistar. Os animais foram divididos em quatro grupos: D (defeito ósseo), DL (defeito ósseo e laser), DPRF (defeito ósseo e PRF) e DPRFL (defeito, PRF e laser). Seis animais de cada grupo foram eutanasiados após 30 e 60 dias e processados histologicamente. Avaliaram-se contagem total de células, presença de angiogênese e área de reparo ósseo formada. **Resultados:** Em análise entre os grupos, houve uma diferença significativa no número total de células entre o grupo D e o grupo DPRFL após 30 ($p^{***} < 0,001$) e 60 dias ($p^{**} < 0,01$), além de maior presença de angiogênese ($p^{**} < 0,01$) entre o grupo D e o grupo DPRFL. Embora a diferença não tenha sido significativa, o grupo DPRFL apresentou maior área de reparo em defeito ósseo criado após 30 dias. **Conclusão:** A membrana autóloga de fibrina rica em plaquetas teve um efeito positivo na neoformação óssea e quando associada à laserterapia de baixa intensidade apresentou maior espessura óssea vertical.

Palavras-chave: fibrina rica em plaquetas; laser de baixa intensidade; regeneração óssea.

SILVA, Lorena Ferraz Santos. **Application of platelet-rich fibrin and photobiomodulation in guided bone regeneration: an experimental study in rats.** 2024. Advisor: Paula Mathias de Moraes Canedo. 61 s. ill. Doctorate Dissertation (Post-graduate Program in Interactive Processes of Organs and Systems) – The Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador.

ABSTRACT

Introduction: Bone loss can result from various etiological factors, such as traumas, pathological injuries, or tissue atrophy following the loss of dental units. The pursuit of improvements that assist or lead to bone repair to restore the anatomical pattern has increased. Autologous platelet-rich fibrin (PRF) membrane has been used to aid this process of bone neoformation, demonstrating good results, as has low-level laser therapy (LLLT). **Objective:** To investigate the effect of LLLT ($\lambda = 830$ nm), with the use of the PRF membrane, on bone neoformation. **Methodology:** This membrane was obtained from intracardiac puncture of donor rats. A bone defect was created in the calvaria of 48 Wistar rats, which were divided into four groups: D (bone defect), DL (bone defect and laser), DPRF (bone defect and PRF), and DPRFL (defect, PRF, and laser). Six animals from each group were euthanized after 30 and 60 days and processed histologically. Total cell count, presence of angiogenesis, and area of formed bone repair were evaluated. **Results:** In the analysis between groups, there was a significant difference in the total number of cells between groups D and DPRFL after 30 ($p^{***} < 0.001$) and 60 days ($p^{**} < 0.01$), as well as a greater presence of angiogenesis ($p^{**} < 0.01$). Although the difference was not significant, group DPRFL showed a greater area of repair in bone defect created after 30 days. **Conclusion:** PRF had a positive effect on bone neoformation, and when associated with LLLT, it showed greater vertical bone thickness.

Keywords: platelet-rich fibrin; low-level laser therapy; bone regeneration.

LISTA DE FIGURAS E QUADRO

Figura 1	(a) Coágulo de PRF. (b) Coágulo removido. (c) Membrana de fibrina	35
Figura 2	Tricotomia prévia ao procedimento cirúrgico	35
Figura 3	(a) Defeito ósseo em calota craniana de rato. (b) Remoção de tampão ósseo preservando a dura-máter	36
Figura 4	(a) e (b) Membrana de PRF posicionada em defeito ósseo	37
Figura 5	Peça cirúrgica enviada ao laboratório	38
Figura 6	Gráfico com comparação quantitativa do número total de células após 30 e 60 dias entre grupos	42
Figura 7	Gráfico com comparação quantitativa de angiogênese após 30 e 60 dias entre grupos	43
Figura 8	Grupo D-Observação histológica/gráfico comparando número de células totais e angiogênese após 30 e 60 dias	44
Figura 9	Grupo DL- Observação histológica/gráfico comparando número de células totais e angiogênese após 30 e 60 dias	44
Figura 10	Grupo DPRF-Observação histológica/gráfico comparando número de células totais e angiogênese após 30 e 60 dias	45
Figura 11	Grupo DPRFL-Observação histológica/gráfico comparando número de células totais e angiogênese após 30 e 60 dias	45
Figura 12	Gráfico com comparação da área de reparo após 30 e 60 dias entre grupos	46
Quadro 1	Estudos utilizando a laserterapia e concentrado plaquetário em regeneração óssea guiada – Brasil 2023	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – molécula energética das células

A-PRF – Advanced-PRF

BMPs – proteínas ósseas morfogenéticas β

TCP – fosfato beta-tricálcico

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CP – Concentrado Plaquetário

D – defeito ósseo

DL – defeito ósseo e laserterapia

DNA – ácido desoxirribonucleico

DPRF – defeito ósseo e PRF

DPRFL – defeito ósseo + PRF + laserterapia

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

FGEV – fator de crescimento endotelial vascular

FGI – fator de crescimento semelhante à insulina

FGDP – fator de crescimento derivado de plaquetas

GaAlAs – Arseneto de gálio e alumínio

(HAp) – Hidroxiapatita

HE – Hematoxilina-Eosina

ICS – Instituto de Ciências da Saúde

IGF – Fator Semelhante à Insulina

LBI – Laserterapia de baixa intensidade

NRS – escala de classificação numérica da dor

PHT – hormônio paratormônio

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

POH – perda óssea horizontal

POV – perda óssea vertical

PPP – do inglês Platelet-Poor Plasma

PRF – do inglês, Platelet Rich Fibrin- Fibrina rica em plaquetas

PRP – do inglês: Platelet-Rich Plasma

RER – retículo endoplasmático rugoso

ROG – Regeneração Óssea Guiada

RTL – redução total da largura

TGF β 1 e β 2 – Fator de crescimento transformante β 1 e β 2

TMC – tomografia microcomputadorizada

TFBM – Terapia Fotobiomoduladora

UFBA – Universidade Federal da Bahia

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 CONCENTRADOS PLAQUETÁRIOS.....	16
2.2 LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE.....	20
2.2.1 Laserterapia e a regeneração óssea guiada	25
2.3.1 Concentrado Plaquetário e laserterapia	27
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO.....	32
3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	32
4 METODOLOGIA	33
4.1 PREPARO DA MEMBRANA DE PRF	34
4.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	35
4.3 PARÂMETROS DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LASER.....	37
4.4 MORTE DOS ANIMAIS.....	38
4.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	38
4.6 ANÁLISE DE DADOS	39
4.7 Análise estatística	39
5 RESULTADOS	41
5.1 AVALIAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS ENTRE GRUPOS.....	41
5.2 AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE ENTRE GRUPOS	42
5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E QUANTITATIVA POR GRUPO	43
6 DISCUSSÃO	47

7 CONCLUSÃO51

REFERÊNCIAS52

ANEXO - Aprovação da Comissão de Ética o Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS/UFBA)61

1 INTRODUÇÃO

A "fibrina" é uma proteína e sua designação se origina do latim, onde "fibr" significa fibra, indicando a sua natureza fibrosa. O sufixo "-ina" é comumente utilizado em Química e Bioquímica para designar substâncias, especialmente compostos orgânicos ou proteínas.

Trata-se de uma proteína essencial no processo de coagulação sanguínea. Ela é formada no plasma sanguíneo pela ação da enzima trombina sobre o fibrinogênio, uma proteína solúvel. Quando ocorre uma lesão vascular, a trombina converte o fibrinogênio em fibrina insolúvel, que se agrega formando uma rede de fibras. Essa malha de fibrina constitui o componente principal dos coágulos sanguíneos, trabalhando para estancar o sangramento e iniciar o processo de cicatrização (Vilar et al., 2020). Características estruturais na molécula de fibrina determinam as propriedades físicas dos coágulos e é importante para o coágulo de sangue suportar o fluxo arterial, contração do coágulo pelas plaquetas e demais forças dinâmicas sofridas (Litvinov et al., 2021; Reddy et al., 2021).

O processo de formação de fibrina é complexo e altamente regulado, envolvendo várias outras proteínas e enzimas. Distúrbios nesse processo podem levar a problemas de coagulação, como a coagulação excessiva (trombose) ou insuficiente (hemorragia) (Jahani; Sherafat et al., 2020).

Há uma cascata de reações moleculares e celulares que levam ao selamento da lesão vascular com um agregado de plaquetas, que interrompem a hemorragia pela formação de um tampão no tecido lesado, desencadeando os próximos passos da regeneração tecidual (Vilar et al., 2020). O seu uso tem sido de forma isolada ou associada com enxertos ósseos, principalmente em procedimentos que visam à regeneração óssea.

A aplicação desse mediador biológico, que contribui para neoformação óssea, foi relacionada à redução do tempo de reparo ósseo (Castro et al., 2017), a um aumento da angiogênese e à diminuição do infiltrado inflamatório (Sherif et al., 2015). Além dessas propriedades, foi observado que a fibrina autóloga possui altas concentrações de fatores de crescimento (Dohan; Ehrenfest, 2010) e de células imunes do hospedeiro, as quais atuam promovendo o reparo local de feridas e combatendo infecções.

A obtenção da Fibrina Rica em Plaquetas (PFR) se destaca por ser um processo simples e de custo reduzido, o que praticamente elimina o risco de rejeição. Devido à facilidade de obtenção e à robustez da sua rede de fibrina, conforme citado por Galav et al. (2016), este biomaterial tem se mostrado eficiente no tratamento de lesões ósseas.

Pesquisas indicam que o uso da PRF, seja de forma isolada ou em combinação com enxertos autógenos, xenoenxertos (Oliveira et al., 2015) e β -TCP (Nacopoulos et al., 2014), promove e intensifica a regeneração óssea. Portanto, o uso deste concentrado plaquetário em terapias focadas no reparo ósseo é de grande interesse na área da Odontologia.

Entretanto, na busca por uma recuperação mais rápida e eficaz, tanto morfológica, quanto funcional, dos tecidos danificados, pode-se recorrer à combinação de múltiplas terapias (sendo assim, um conjunto de tratamentos complementares). Uma dessas terapias é o uso do laser de baixa potência (LLLT), que tem propriedades estimulantes para os tecidos, mediante luz vermelha ou infravermelha. Essa abordagem tem a capacidade de modular o processo de cicatrização, contribuindo para a redução da dor e o aumento da vascularização nos tecidos (Anders et al., 2015). Além disso, promove um aumento na produção de ATP mitocondrial, entre outros benefícios (Anders et al., 2015; Hamblin et al., 2016).

Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a qualidade do tecido ósseo formado em um defeito ósseo crítico criado na calvária de ratos, utilizando-se a membrana de PRF, seja em combinação ou não com o uso do laser de diodo ou laser de baixa intensidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA.

Esta seção compreende a base teórica que deu sustentação ao desenvolvimento deste estudo.

2.1 CONCENTRADOS PLAQUETÁRIOS

Sistemas de concentrado sanguíneo ganharam importância crescente em diferentes campos da Medicina regenerativa na última década (Ghanaati et al., 2014). Concentrados sanguíneos são obtidos do próprio sangue periférico do paciente (Schär et al., 2015). Com isso, os componentes do sangue como leucócitos, plaquetas, proteínas plasmáticas e fatores de crescimento são concentrados após centrifugação e preparados usando diferentes protocolos (Kubesch et al., 2018).

Os concentrados plaquetários inicialmente foram desenvolvidos para tratar e prevenir hemorragias decorrentes de trombocitopenia grave e o produto resultante utilizado em transfusões ficou conhecido como PRP (Christensen et al., 2006). Posteriormente, a utilização de derivados sanguíneos para promover o fechamento de feridas e estimular o processo de cicatrização teve início com a introdução de colas de fibrina, compostas por fibrinogênio concentrado, cuja polimerização é induzida por trombina e cálcio (Matras, 1970). A obtenção da cola autóloga de fibrina é considerada uma das opções mais seguras, no entanto, seu processo é intrincado e dispendioso (Gibble; Ness, 1990). Desde então, os benefícios proporcionados pelos produtos sanguíneos têm sido objeto de estudo contínuo, levando ao desenvolvimento de novos protocolos, kits e centrífugas para superar as complexidades associadas.

Nesse cenário, Choukroun et al. (2001) desenvolveram a fibrina rica em leucócitos e plaquetas (L-PRF, do inglês *Leukocyte-Platelet Rich Fibrin*), como um coadjuvante terapêutico para aprimorar a cicatrização de feridas e a regeneração de tecidos após procedimentos cirúrgicos intraorais. A L-PRF é considerada um concentrado plaquetário de segunda geração, caracterizado por um método de obtenção simples, sem manipulação bioquímica ou adição de substâncias externas à amostra sanguínea (Dohan et al., 2006). Para obtê-la, o sangue venoso é coletado e centrifugado em tubos de vidro ou plástico com jateamento de sílica, sem anticoagulantes. Esse processo resulta em três camadas distintas: corpúsculos vermelhos no fundo devido à densidade das hemácias, uma camada intermediária representando o coágulo de

PRF, que contém uma quantidade significativa de plaquetas e leucócitos, e o plasma pobre em plaquetas ou acelular no topo do tubo. A membrana de PRF apresenta uma estrutura tridimensional e densa, proporcionando a retenção eficaz de plaquetas e leucócitos (Dohan et al., 2010).

Esses componentes, por sua vez, desempenham um papel fundamental ao liberar citocinas e fatores de crescimento, contribuindo de maneira crucial no processo de cicatrização (Dohan et al., 2006; Dohan et al., 2010). Os neutrófilos e macrófagos desempenham a função de eliminar bactérias e tecidos necrosados por meio da fagocitose, realizando a debridamento da ferida e prevenindo infecções secundárias. Em contrapartida, plaquetas e macrófagos secretam diversos fatores de crescimento, como o fator de crescimento beta 1 (TGF- β 1), fator de crescimento derivado de plaquetas (FGDP), fator de crescimento endotelial vascular (FGEV) e fator de crescimento semelhante à insulina (FGI). Esses elementos contribuem para a cicatrização de feridas estimulando processos como a reepitelização, a angiogênese e a formação da matriz extracelular (Tsirogianni et al., 2006). Em comparação com outros concentrados plaquetários, constatou-se que a PRF apresenta a liberação de níveis mais elevados de fatores de crescimento ao longo de um período de até 10 dias (Dohan et al., 2010). Além de liberar proteínas bioativas, a rede de fibrina rica em plaquetas também desempenha a função de suporte para a migração celular (Oliveira et al., 2015) e passa por uma degradação gradual ao longo do tempo (Pluemsakunthai et al., 2013).

Em consonância com os resultados anteriores, Lourenço et al. (2018) constataram uma elevada liberação de fatores de crescimento (PDGF, bFGF e VEGF) nas primeiras 24 horas, com uma posterior redução ao longo do tempo, embora concentrações significativas tenham sido mantidas após três semanas. Tanto citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4 e IL-1-RA) quanto pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ), apresentaram picos de liberação em momentos distintos, mantendo elevadas taxas de fracionamento por até 21 dias. Além disso, quimiocinas relevantes para o reparo tecidual foram produzidas em quantidades substanciais ao longo do período experimental.

Esses achados indicam que a membrana de fibrina derivada do sangue exibe uma notável estabilidade estrutural e conteúdo celular. Estudos em diferentes áreas, tanto *in vitro* quanto em animais, confirmaram que a PRF aprimora a cicatrização de tecidos moles, estimulando a angiogênese e a proliferação celular (Dragonas et al., 2019; Miron et al., 2017). Além de exercer efeitos benéficos nos tecidos moles, a aplicação da PRF também demonstrou associação com resultados positivos no reparo e regeneração do tecido ósseo. Em comparação com uma

membrana de colágeno de origem suína, amplamente utilizada, a PRF mostrou-se capaz de proporcionar resultados superiores em termos de proliferação de osteoblastos e células periosteais *in vitro* (Gassling et al., 2010; Gassling et al., 2013).

Adicionalmente, a PRF tem sido utilizada para mitigar a inflamação pós-operatória (Ozgul et al., 2015; Uyanik et al., 2015), reduzir a dor relatada pelo paciente (Kumar et al., 2016) e diminuir a incidência de alveolite, após a extração de terceiros molares (Eshghpour et al., 2014; Hoaglin; Lines, 2013). A eficácia desse concentrado plaquetário na cicatrização também foi investigada em contextos de regeneração periodontal e cirurgia plástica. Diante dos benefícios relatados, estudos pré-clínicos *in vitro* têm empregado a PRF em diversas indicações de cirurgia periodontal e oral. Uma metanálise revelou uma diferença significativa na redução da profundidade de sondagem (1,1 mm), ganho de inserção clínica (1,2 mm) e ganho ósseo (1,7 mm) em defeitos intraósseos, favorecendo o debridamento com retalho aberto e o uso de PRF em comparação ao debridamento, sem o uso desse concentrado plaquetário (Castro et al., 2017). Na Implantodontia, a PRF também tem sido amplamente empregada para aprimorar e acelerar a cicatrização dos tecidos, sendo utilizada como coágulo, associada a enxertos ósseos ou como membrana. De fato, uma das primeiras aplicações da PRF na Odontologia foi na Implantodontia (Choukroun et al., 2006).

Contudo, foram relatados resultados variáveis quanto aos benefícios associados ao uso da PRF em procedimentos envolvendo implantes dentários e em defeitos ósseos. Enquanto alguns estudos indicam que a adição de PRF em procedimentos de aumento do seio maxilar acelera a formação óssea e reduz a reabsorção óssea alveolar (Choukroun et al., 2006; Temmerman et al., 2016), outros não observaram ganhos em aplicações semelhantes (Zhang et al., 2012; Suttapreyasri; Leepong, 2013).

Após o uso da PRF em levantamento de seio maxilar, Bosshardt et al. (2014) e Gassling et al. (2013) avaliaram os resultados histomorfométricos, em comparação com uma membrana de colágeno absorvível (Bio-Gide; Geistlich, Wolhusen, Suíça), utilizada para cobrir a janela lateral de acesso ao seio maxilar. Ambos os estudos não relataram diferenças na proporção de formação óssea vital e material de enxerto residual após 5 a 11 meses, indicando um resultado positivo para a Implantodontia, uma vez que a membrana de PRF apresenta custo inferior em comparação à membrana de colágeno comercial.

Quanto à Preservação da Crista Alveolar, estudos compararam a perda óssea horizontal (POH) e a Perda Óssea Vertical (POV) em cavidades pós-extração, tratadas com PRF ou com apenas o coágulo sanguíneo (Temmerman et al., 2016; Suttapreyasri, Leepong, 2013; Alzahrani et al.,

2017). Moussa et al. (2016) estudaram os efeitos do recobrimento de blocos de enxertos autógenos com a membrana de PRF, em que puderam observar uma maior reabsorção do enxerto ósseo na ausência da membrana de LPRF ($0,8 \pm 0,6$ mm vs. $1,6 \pm 0,9$ mm) após 4 meses.

O concentrado plaquetário de segunda geração tem sido empregado, tanto de forma isolada, quanto em combinação com outras terapias, como os substitutos ósseos, de modo a constituir-se em complemento valioso para o processo de neoformação óssea. Nesse sentido, Abdullah (2016) conduziu um estudo comparativo da regeneração óssea em defeitos não críticos na calvária de ratos, utilizando PRF isolada e PRF associada ao fosfato beta-tricálcico (β -TCP). Os animais foram distribuídos em três grupos distintos: Grupo I, em que os defeitos foram preenchidos apenas com PRF isolada; Grupo II, composto por defeitos preenchidos com PRF associada ao fosfato beta-tricálcico (β -TCP); e Grupo III, o controle, no qual ocorreu o reparo espontâneo. Os animais foram sacrificados em intervalos de 1, 2, 3, 4 e 6 semanas após as cirurgias. Por meio de Tomografia Microcomputadorizada (TMC), avaliou-se a neoformação óssea e a densidade mineral óssea. Embora as diferenças nos resultados com e sem a adição de PRF ao β -TCP tenham mostrado significância estatística apenas nas semanas 3 e 6, tornou-se evidente que o grupo que recebeu a combinação apresentou melhores resultados, sugerindo, assim, um efeito sinérgico desse tratamento.

Buscando ainda promover pesquisas em relação à reabilitação óssea, Karayürek et al., (2019) se basearam na hipótese de que o uso da PRF com materiais de enxerto ósseo poderia aumentar a regeneração. Nos defeitos ósseos criados na calota de coelhos, avaliaram os aspectos histopatológicos e imuno-histoquímicos após a aplicação da PRF com enxerto autógeno, xenoenxerto e β -TCP. Como conclusão, o estudo revela que, em termos de neoformação óssea, a combinação de enxerto autógeno com PRF apresentou resultados superiores, enquanto a associação de β -TCP com PRF não demonstrou diferença significativa em comparação ao grupo tratado apenas com β -TCP. No entanto, ressalta-se que estudos adicionais, tanto experimentais quanto clínicos, são necessários para proporcionar maior clareza sobre o mecanismo exato e os resultados associados à combinação de PRF com enxertos ósseos no processo de cicatrização óssea.

A obtenção do coágulo de fibrina e a ativação plaquetária são induzidas pela cascata de coagulação que ocorre durante o processo de centrifugação. Durante essa fase, a trombina endógena reage com o fibrinogênio, resultando na formação do coágulo de fibrina. Conseqüentemente, o soro sobrenadante obtido após a centrifugação perde a capacidade de coagulação. Diversas tentativas recentes têm sido realizadas para otimizar os protocolos

destinados à aplicação clínica da PRF. Uma dessas inovações é a A-PRF (Advanced-PRF), desenvolvida por velocidades mais lentas e menor tempo de centrifugação (1400 rpm ou 200 g por 8 minutos) (Fujioka-Kobayashi et al., 2017). Essa técnica permite a comparação entre A-PRF e PRF convencional quanto aos efeitos da força centrífuga, como velocidade e tempo, na formação óssea alveolar, aspecto crucial para a regeneração tecidual (Clark et al., 2018). Com o propósito de esclarecer o efeito da A-PRF na formação óssea, Moraschinio e Barboza (2016) aplicaram coágulos de A-PRF nos alvéolos de pré-molares, após extrações dentárias em cães da raça Beagle. A avaliação da neoformação óssea foi conduzida por meio de exames histológicos e de imunofluorescência, realizados 14 e 30 dias após as cirurgias. Os resultados do exame histológico revelaram a presença de osso recém-formado, preenchendo até o centro das cavidades no grupo tratado com A-PRF após 14 dias. Já após 30 dias, foram observadas trabéculas de osso denso e regular dispostas em um padrão poroso. Expressões mais elevadas de osteocalcina e osteopontina foram observadas no osso recém-formado no grupo A-PRF, em comparação ao grupo controle. Os autores chegaram à conclusão de que a aplicação da A-PRF pode resultar em nova formação óssea e acelerar o reparo ósseo. Além desses resultados, observou-se um aumento na atividade osteoblástica no grupo tratado com A-PRF, sugerindo que essa abordagem pode ser útil para promover a formação óssea na área de Odontologia e de Medicina.

Com base nas informações apresentadas, pode-se afirmar que, embora a PRF pertença a uma nova geração de concentrados plaquetários, sua estrutura consiste fundamentalmente em fibrina, o que é suficiente para explicar sua capacidade cicatricial. Além disso, a polimerização lenta da membrana de PRF confere um efeito particularmente benéfico à arquitetura fisiológica, favorecendo o processo de cicatrização.

Contudo, é essencial aprofundar a investigação nas características plaquetárias e inflamatórias desse biomaterial. Uma compreensão completa de sua fisiologia e significado permitirá uma interpretação mais precisa dos resultados clínicos obtidos, proporcionando a expansão dos possíveis campos de aplicação dessa terapêutica e seus protocolos.

2.2 LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE

Com o aumento da disponibilidade de lasers no início dos anos de 1970, surgiram oportunidades para explorar seu potencial como uma modalidade de reparo para diversos tecidos conjuntivos

(Nissan et al., 2006). Desde sua introdução na década de 1960, a terapia a laser de baixa intensidade (LBI) tem sido amplamente aplicada em várias áreas da Odontologia, desempenhando um papel crucial em cuidados pós-cirúrgicos, remodelação óssea, restauração neural, alívio da dor orofacial e, mais recentemente, no tratamento da doença periodontal (Sun et al., 2004).

A capacidade do laser de baixa intensidade de estimular processos fotoquímicos em nível celular tem proporcionado benefícios significativos. Em contextos pós-cirúrgicos, a LBI tem demonstrado acelerar a cicatrização de tecidos moles e reduzir a inflamação. Na remodelação óssea, sua aplicação visa promover a regeneração óssea e melhorar a integração de implantes dentários. A terapia também tem se mostrado eficaz no alívio da dor orofacial, oferecendo uma abordagem não invasiva para gerenciar desconfortos associados a diversas condições. O crescente corpo de evidências científicas respalda a eficácia e a versatilidade da LBI na Odontologia, consolidando sua posição como uma ferramenta valiosa em uma variedade de procedimentos e tratamentos.

Diferentes tipos de lasers, abrangendo variados comprimentos de onda, como hélio-neônio (632,8 nm), arseneto de alumínio e gálio (805 ± 25 nm) e arseneto de gálio (904 nm), foram empregados em diferentes doses e regimes de tratamento (Basford Jr., 1995; Walsh, 1997). O uso do arseneto de alumínio e gálio (GaAlAs), conhecido como laser de diodo e utilizado no presente estudo, é categorizado como de baixa potência ou baixa intensidade, sendo cada vez mais adotado na Odontologia. Apesar de sua baixa potência, o laser de diodo exibe uma boa profundidade de penetração em comparação com outros tipos de lasers.

Os efeitos fisiológicos dos lasers de baixa potência se manifestam em nível celular, podendo tanto estimular quanto inibir atividades de proliferação bioquímica e fisiológica, além de modificar a comunicação intercelular (Belkin; Schwartz, 1989; Karu, 1989; Noba et al., 2018). Essa influência no metabolismo celular resulta em um aumento nas funções dos tecidos lesionados e irradiados (Noba et al., 2018).

Essa modificação ocorre devido à absorção de fótons pelo complexo IV, localizado na membrana interna das mitocôndrias, resultando no aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP) e, por conseguinte, na melhoria da funcionalidade celular (Hamad et al., 2016; Brawn, Kwong, 2007; Karu et al., 2005). No tecido ósseo, a aplicação do laser induz o reparo ósseo ao ativar os osteoblastos, promovendo a proliferação e a diferenciação dessas células, resultando na neoformação da matriz óssea (Stein et al., 2005).

Essa ativação celular e o aumento na produção de ATP desencadeiam uma série de eventos benéficos, como aceleração da cicatrização de feridas, redução da inflamação, estímulo à regeneração tecidual e melhoria geral na função celular. Esses efeitos tornam a terapia a laser de baixa intensidade uma ferramenta valiosa em diversos campos da Odontologia e Medicina. No intuito de auxiliar no reparo ósseo, têm sido estudadas novas alternativas terapêuticas, sendo a laserterapia uma delas. Nessa abordagem, a fonte de luz é o laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), que se diferencia das fontes de luz convencionais por dispor de um único comprimento de onda. Essa característica permite uma propagação de luz de forma coerente no espaço, carregando boas quantidades de energia de maneira colimada e direcional (Pinheiro et al., 2010). Para a correta utilização desse tipo de energia, é fundamental compreender alguns parâmetros físicos. O primeiro deles é a quantidade de energia, medida em joules (J), fornecida por uma fonte luminosa, diretamente proporcional à potência do aparelho emissor (medida em watts [W]), e ao tempo de exposição do tecido a essa energia (medido em segundos).

O reparo ósseo, por sua vez, foi observado em diferentes estudos independentemente do procedimento cirúrgico realizado. No entanto, a maior parte das pesquisas foi realizada considerando a extração dentária (Noba et al., 2018). Especialmente nesse tipo de intervenção, observa-se, ao longo do tempo, que o osso trabecular formado se torna mais compacto, assumindo um padrão lamelar concêntrico, o que sugere um tecido ósseo maduro, enquanto o local cirúrgico não irradiado apresenta osso trabecular imaturo, com grandes espaços de medula óssea (Hamad et al., 2016).

A aplicação da LBI também foi avaliada após a instalação de implantes para acelerar a osseointegração (Prados-Frutos et al., 2016), assim como na cicatrização de tecidos moles (Han et al., 2016), apresentando resultados satisfatórios. Importante destacar que as características histológicas mencionadas nos estudos acima foram observadas ao utilizar o laser de baixa intensidade, especificamente o laser de diodo (GaAlAs).

Na última década, diversos estudos têm investigado os efeitos da Laserterapia de Baixa Intensidade (LBI) na neoformação óssea (Khadra et al., 2004; Choi et al., 2013), devido ao aumento da atividade osteoblástica (Migliario et al., 2014), vascularização (Khadra et al., 2004) e organização de fibras colágenas (Pinheiro; Gerbi, 2006). Estudos *in vitro* têm indicado que esse tipo de laserterapia exerce um efeito bioestimulador em células osteogênicas e tecidos ósseos (Huertas et al., 2014; Amid et al., 2014).

Da mesma forma, estudos *in vivo* revelaram que o uso do laser de baixa intensidade aumenta o reparo ósseo em defeitos ósseos padronizados, além de melhorar a neoformação óssea em fraturas artificiais (Ghahroudi et al., 2014; Shakouri et al., 2010). Adicionalmente a esses resultados, foi observada a indução na atividade da fosfatase alcalina e o aumento da expressão gênica da osteocalcina, quando o laser de diodo foi aplicado, contribuindo assim para a formação óssea (Renno et al., 2010; Oliveira, 2017).

Embora tenha se observado a ação da laserterapia em nível celular, na literatura existem resultados controversos quanto ao uso da LBI e seus efeitos nas atividades celulares (Conlan et al., 1996). No entanto, há estudos onde a laserterapia promoveu a proliferação e a diferenciação de osteoblastos (Stein et al., 2005), bem como a inibição e a diferenciação de osteoclastos (Xu et al., 2009), além de induzir o processo de mineralização (Fukuhara et al., 2006). Muito embora alguns estudos afirmem que as etapas de proliferação e crescimento celular podem permanecer inalteradas, foi observado em diferentes tipos celulares (como osteoblastos e fibroblastos), que quando expostos a diferentes doses de irradiação há proliferação dessas células. (Stein et al., 2008).

A combinação específica entre comprimento de onda e dose aplicada pode influenciar nas diferentes respostas para cada tipo celular (Schwartz-Filho et al., 2011). Considerando a variedade de protocolos utilizados com uso do laser para diferentes tipos de células e de estudo, é necessária, portanto, uma investigação dos parâmetros fotobiomoaduladores e dos efeitos reais da LBI. Nesse sentido, tem sido aceito que esse tipo de laserterapia produz melhores resultados quando administrado em doses baixas, quando comparado a doses altas (Huang et al., 2009). Além disso, doses acima de 20 J/cm² foram relatadas por apresentarem ação inibitória (Seifi et al., 2007; Goulart et al., 2006), o que é controverso na literatura.

O estudo de Altan et al. (2015) igualmente verificou que a laserterapia de baixa intensidade, com doses de 5 e 6.300 J/cm², era significativamente eficaz, enquanto a dose de 20 J/cm² não mostrou efeito significativo no aumento da formação óssea. Entretanto, Saito e Shimizu (1997) utilizaram doses elevadas de 6.354 e 21.180 J/cm² e obtiveram resultados positivos, revelando um estímulo dose-dependente da formação óssea via laserterapia. Em outro estudo, Silva et al., (2012) usaram dose de 160 J/cm² e similarmente alcançaram resultados significativos. Esses resultados revelam que a eficiência da laserterapia é alterada de acordo com a dose aplicada, o que já havia sido observado nos estudos de Gross e Jelkmann (1990) e Sattayut et al. (1999), nos quais demonstraram que a dose muito baixa da LBI não apresenta efeito, a dose muito alta

pode resultar em pouco ou nenhum efeito, enquanto que a dosagem extrema pode levar à inibição dos efeitos produzidos pelo laser.

Esses resultados confirmam o que Khadra et al. (2004) observaram, quando foi utilizada a LBI (laser de diodo GaAlAs, 830 nm, 23 J/cm²) em defeitos ósseos criados em calvárias de ratos para avaliar o seu efeito sobre o reparo e o crescimento ósseo. No experimento, os animais foram mortos em dois tempos (14 e 28 dias). Em ambos os tempos de morte, as amostras de tecido que receberam a LBI continham significativamente mais cálcio e fósforo após 14 dias ($p = .002$ e $p = .006$ respectivamente) e após 28 dias ($p = .002$ e $p = 0.039$) do que nos grupos em que não foi aplicado o laser, assim como o teor relativo de proteínas foi maior no grupo irradiado após 14 e 28 dias ($p = 0.013$ e $p = 0.015$, respectivamente). As análises histológicas revelaram angiogênese e formação de tecido conjuntivo mais pronunciadas nos grupos irradiados após 14 dias ($p = 0.01$ e $p = 0.04$, respectivamente), mas não após 28 dias. A formação óssea foi maior no grupo experimental ($p = 0.008$ e $p = 0.002$) do que nos demais grupos, nos dois tempos de morte (Khadra et al., 2004).

Diante do que foi encontrado na literatura, é possível observar a falta de padronização dos parâmetros utilizados na LBI, o que, muitas vezes, justifica os diferentes resultados encontrados. Além dos parâmetros do laser, é importante considerar outros cofatores que igualmente podem afetar a dose administrada, como a profundidade do tecido-alvo. Trata-se de um cofator importante, pois a quantidade de energia diminui à medida que a profundidade do tecido aumenta. Esse foi um dos motivos que impulsionaram a utilização do comprimento de onda no espectro infravermelho. Devido à sua boa penetração de luz, há uma menor perda de eficiência comparada aos outros lasers, podendo atingir até 37% de sua intensidade após uma profundidade de 2 mm (Basfor, 1995).

Embora ainda não haja uma padronização nos protocolos da LBI, o conceito e o mecanismo de fotobiomodulação em feridas por esse tipo de terapia têm atraído considerável atenção. Estudos de uma revisão sistemática sobre o uso de lasers em cirurgia oral, avaliando reparo ósseo, mostraram que a LBI é indicada para melhorar a neoformação e a mineralização óssea (Noba et al., 2018). Entretanto, os parâmetros aplicados nesses estudos variaram na potência e no tempo de irradiação (Almeida et al., 2017; Hamad et al., 2016; Monea et al., 2016; Romao et al., 2015; Zaky et al., 2016). Mesmo com diferentes protocolos, alguns dos estudos concordaram que a LBI estimula a biomodulação da neoformação óssea por meio da osteogênese, diminuindo o tempo de reparo do tecido ósseo (Almeida et al., 2017; Hamad et al., 2016; Zaky et al., 2016).

Embora haja resultados controversos na literatura quanto aos efeitos da Laserterapia de Baixa Intensidade (LBI) nas atividades celulares (Conlan et al., 1996), existem estudos em que a laserterapia promoveu a proliferação e a diferenciação de osteoblastos (Stein et al., 2005) e inibição da diferenciação de osteoclastos (Xu et al., 2009), além de induzir o processo de mineralização (Fukuhara et al., 2006). Alguns estudos, no entanto, afirmam que as etapas de proliferação e crescimento celular podem permanecer inalteradas quando expostas a diferentes doses de irradiação, observado em diferentes tipos celulares, como osteoblastos e fibroblastos (Stein et al., 2008).

2.2.1 Laserterapia e a regeneração óssea guiada

Com o objetivo de aprimorar a Regeneração Óssea Guiada (ROG), várias técnicas têm sido empregadas para viabilizar e acelerar a neoformação óssea. Isso inclui o uso de membranas biocompatíveis, substitutos ósseos e a crescente associação da laserterapia a essas técnicas, com o intuito de obter uma qualidade óssea otimizada. A combinação dessas abordagens busca não apenas proporcionar suporte estrutural, mas também promover um ambiente propício para a regeneração e o reparo eficazes do tecido ósseo, especialmente em procedimentos odontológicos e cirurgias maxilofaciais.

De acordo com a lei de Arndt-Schultz, as reações biológicas desejáveis devem ser desencadeadas dentro de uma janela terapêutica (Huang et al., 2009). Doses abaixo desse intervalo não são suficientes para fazer a diferença e doses acima desse intervalo podem ter efeitos inibitórios. Lasers com comprimentos de onda na faixa vermelha e infravermelha exibem menor absorção por água e cromóforos teciduais (hemoglobina e melanina), penetrando mais profundamente no tecido (5–10 mm) (Huang et al., 2009; Cobb et al., 2020).

Enquanto isso, estudos *in vitro* e em animais mostraram que a LLLT suprime a inflamação no tecido periodontal pela modulação da resposta imune local e pela redução da produção e liberação de certas citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e prostaglandina E2 20-23. Além disso, descobriu-se que a LLLT melhora a microcirculação local por angiogênese e vasodilatação, aliviando o edema tecidual e a inflamação (Schaffer et al., 2000).

Nessa perspectiva, avaliando a LBI associada a substitutos ósseos, o estudo de Pinheiro et al., (2003) investigou os efeitos da laserterapia (830nm e 4J/cm²) associada ao enxerto ósseo

Genox®, em defeitos ósseos criados no fêmur de ratos Wistar, em que foi possível observar que, no grupo irradiado, o reparo ósseo foi maior e caracterizado pelo aumento da neoformação óssea e quantidade de fibras colágenas ao redor do enxerto, a partir do 15º dia após cirurgia.

Ao examinar os efeitos da terapia com laser de baixa intensidade (LBI) em conjunto com substitutos ósseos, Rasouli et al. (2014) investigaram o impacto da laserterapia (810 nm, 300 mW, 4 J/cm², GaAlAs), associada ao Bio-Oss® no processo de osteogênese em defeitos criados na calvária de coelhos. Cada animal teve quatro defeitos de 8 mm de diâmetro na calvária. Um defeito permaneceu como controle com apenas coágulo sanguíneo, o segundo foi preenchido com Bio-Oss®, o terceiro foi tratado com laser e o quarto com Bio-Oss® e laser. Os resultados mostraram que, na 4ª e 8ª semana, a quantidade média de neoformação óssea foi de 15,83% e 18,5% no grupo controle, 27,66% e 25,16% no grupo irradiado por laser, 35,0% e 41,83% no grupo com apenas Bio-Oss®, e 41,83% e 47,0% no grupo tratado com laser + Bio-Oss®, com diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

Com base nesses dois estudos, as conclusões indicam que a aplicação da terapia com Laser de Baixa Intensidade, em combinação com o material de enxerto, pode impulsionar o reparo ósseo. Essa conclusão leva em consideração a capacidade osteocondutora do substituto ósseo empregado. Fica evidente que o uso desse biomaterial dificulta a formação de fibrose e protege a cavidade, conforme destacado por Batista e Sant'Ana Filho (2001).

Adicionalmente aos substitutos ósseos, o uso de membranas de colágeno na Regeneração Óssea Guiada tem apresentado desafios na migração epitelial para o defeito ósseo, o que poderia comprometer a qualidade do osso neoformado. É crucial que a membrana mantenha um espaço viável para as células osteogênicas do hospedeiro migrarem para a área do defeito, acelerando, assim, o processo de reparo ósseo (Kitayama et al., 2015). Uma membrana eficaz deve ser biocompatível, capaz de criar e manter o espaço necessário, promover a integração tecidual e ser de fácil manuseio. A associação da membrana com enxerto autógeno tem demonstrado melhorar alguns resultados, proporcionando estabilidade ao material de enxerto dentro do defeito ósseo.

Ao analisar a associação dessas técnicas, o estudo de Freitas et al. (2017) conduziu uma investigação sobre as técnicas empregadas na Regeneração Óssea Guiada em combinação com a laserterapia. Foram utilizados 80 ratos Wistar, nos quais criaram defeitos ósseos críticos na calvária. Os animais foram distribuídos em oito grupos: grupo C (controle - apenas coágulo sanguíneo), grupo M (membrana de colágeno - BioGide®), grupo TFBM (terapia de fotobiomodulação), grupo A (osso autógeno), grupo A + TFBM, grupo A + M, grupo TBMT +

M, e grupo A + TFBM + M. A análise histomorfométrica e estatística revelou que todos os grupos apresentaram uma maior área de osso recém-formado, em comparação com o grupo C ($9,96 \pm 4,49\%$). Portanto, os autores concluíram que a utilização da Terapia de Fotobiomodulação (TFBM) pode ser eficaz para o reparo ósseo, especialmente quando associada a técnicas de regeneração óssea.

Do mesmo modo, o estudo feito por Pomini et al. (2019), em defeitos ósseos críticos na calvária de ratos, avaliou um sistema formado por xenoenxerto (Bio-Oss®) e membrana de fibrina (Tisseel Lyo®) associado à laserterapia. Os animais foram mortos após 14 e 42 dias. O sistema formado pelo xenoenxerto e membrana de fibrina, associado ao protocolo de laserterapia, teve efeito positivo no processo de reparo ósseo

Os resultados favoráveis da Laserterapia de Baixa Intensidade no reparo ósseo foram observados mesmo sem a utilização de substitutos ósseos ou membranas de colágeno. Em estudo envolvendo pacientes submetidos a um levantamento de seio maxilar bilateral e instalação simultânea de implantes dentários, a aplicação da LBI ($\lambda = 630\text{--}660\text{ nm}$, 25 mW/cm^2 , 6 min) resultou em neoformação óssea. Os exames de imagem pré e pós-operatórios, realizados após o 1º, 3º e 6º meses, indicaram que o lado submetido à laserterapia apresentou resultados superiores, quanto ao aumento da densidade óssea, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (Mehdiyev et al., 2019).

2.2.2 Concentrado plaquetário e laserterapia

A busca por uma rápida recuperação morfológica e funcional de tecidos lesados muitas vezes envolve a combinação de terapias complementares. Uma abordagem promissora nesse contexto é a Terapia de Fotobiomodulação (PBM), que utiliza laser de baixa intensidade, com luz vermelha ou infravermelha. A LBI tem propriedades de estimulação tecidual, promovendo efeitos bioestimulatórios, como redução da dor, aumento da vascularização tecidual e aprimoramento na produção de ATP mitocondrial (Anders et al., 2015; Hamblin et al., 2016).

A combinação da cola de fibrina com a fotobiomodulação tem apresentado resultados positivos no reparo de lesões de nervos periféricos, sendo eficaz em procedimentos de neurorrafia e melhorando a qualidade da regeneração axonal no coto distal (Buchaim et al., 2012). Além disso, essa abordagem combinada tem demonstrado capacidade de auxiliar no reparo de defeitos ósseos, estimulando a angiogênese e a proliferação de osteoblastos, contribuindo para

a formação de novo osso em períodos pós-operatórios mais curtos e em maior volume (Oliveira CTB et al, 2013).

Apesar dos resultados promissores, ainda existem lacunas na compreensão dos mecanismos da terapia com PBM e seus efeitos quando combinados com compostos de fibrina, como PRF e selantes de fibrina. Embora a Laserterapia de Baixa Intensidade tenha demonstrado resultados positivos no reparo ósseo quando utilizada isoladamente, a incorporação de biomoduladores tem sido uma prática crescente para aprimorar a osseointegração e a formação óssea ao redor de implantes dentários, assim como em casos de perda óssea de diversas origens. Além das opções mencionadas anteriormente, há uma crescente utilização de produtos derivados do sangue, como os concentrados plaquetários (CP), em combinação com a LBI, no campo odontológico.

Estudos científicos destacam o potencial terapêutico notável tanto da Plasma Rico em Fibrina quanto da Laserterapia de Baixa Intensidade na melhoria da neoformação óssea durante o processo de recuperação tecidual. Uma revisão da literatura conduzida por Inchigolo et al. (2022) revelou que a LBI desempenha um papel auxiliar nas respostas do processo de cicatrização tecidual. Além disso, quando aplicadas em conjunto, a LBI e outras terapias demonstraram potencial para acelerar o processo de reparo ósseo. Essa abordagem conjunta favorece a angiogênese e a proliferação de osteoblastos, resultando na formação mais rápida e abundante de novo tecido ósseo, conforme descrito por Iatecola et al. (2013). Alguns estudos já trazem a associação destas duas técnicas na ROG (Quadro 1).

Quadro 1- Estudos utilizando a laserterapia e concentrado plaquetário em regeneração óssea guiada – Brasil 2023

Referência	Tipo de Laser/LED	Comprimento d onda (nm) Potência (mW)	Objetivo	Fibrina	Intervenção	Resultados
Oliveira Gonçalves et al., 2016	GaAIs		Avaliar efeitos da LBI na integração de enxerto ósseo	PRF heteróloga	Defeito ósseo em calvária de rato coberto por enxerto autólogo, removido à direita do osso parietal, com osteotomia de 5 mm, foi adaptado do lado esquerdo com selante de fibrina; grupos: Enxerto	LBI estimulou neoformação óssea e melhorou o processo de integração do
		830 e 30	autólogo estabilizado com selante de fibrina heteróloga.		autólogo de fibrina (AFG) e fibrina autógena + laser (AFGL).	enxerto ósseo autólogo
Pomini et al., 2019	GaAIs	830 e 30	Na calvária de ratos (defeito de tamanho crítico – DSC), para avaliar o arcabouço formado por um selante de fibrina (FS), mais xenoenxerto associado à terapia com PBM	Tisseel Lyo® (Baxter Healthcare Ltd Norfolk, UK)	36 ratos: 4 grupos	Neoformação óssea foi observada em todos os grupos, limitando as margens do defeito. No grupo que recebeu o xenoenxerto e a laserterapia houve maior ganho ósseo.
Hemaid et al., 2019	GaAIs	810 e 100	Observar e comparar o uso combinado de LBI (810 nm), PRF e NanoHA na cicatrização de defeitos periodontais intraósseos.	PRF	16 defeitos ósseos em coelhos divididos em 04 grupos: controle irradiado a laser (CL); controle não tratado (C); grupo tratado com enxerto: PRF + NanoHA e (NanoHA+ PRF + L)	NanoHA+ PRF + L apresentaram densidade óssea significativamente maior em relação aos demais grupos
Thalaimalai et al., 2020	Diodo	810 e 500	Avaliar efeito combinado da LBI e PRF, em sítios com defeitos intraósseos, por retalho, preservando a papila, em doença periodontal.	PRF	LBI associada à PRF resultou em melhor exame clínico e radiográfico após 6 meses.	Avaliar efeito combinado da LBI e PRF, em sítios com defeitos intraósseos, por retalho, preservando a papila, em doença periodontal.

Della Coletta et al., 2021	GaAlAs	830 e 30	Avaliar os efeitos da TFBM em defeitos ósseos na calvária de ratos, preenchida com fosfato de cálcio (BCP) associado à fibrina	BHF	30 ratos Wistar: BMG, defeitos preenchidos com biomaterial e coberto por membrana; BFMG, biomaterial e biopolímero de fibrina (FB) coberto por membrana; e BFMLG, biomaterial e FB coberto por membrana e TFBM	A TFBM se mostrou eficaz, melhorando e acelerando o processo ROG quando associado com BCP e BHF
Buchaim et al., 2022)	GaAlAs	830 e 30	Analisar os efeitos da TFBM em defeito ósseo crítico com xenoenxerto associado a BHF.	BHF	-	A TFBM não diferiu na neoformação óssea, mas apresentou deposição de fibras colágenas mais organizadas. - BHF favoreceu a permanência de partículas do biomaterial em defeito ósseo.
Rosso et al., 2020)	GaAlAs	830 e 30	Avaliar a ação da TFBM, em ratos com defeito tibial, utilizando osso liofilizado da matriz óssea bovina (MB) associado ou não com HFB	BHF	30 em 03 grupos. Defeito ósseo não crítico de 2 mm foi produzido. Grupos: (1) MB + TFBM; (2) MB + BHF; (3): BM + HFB + TFBM. Nos Grupos 1 e 3, os animais foram submetidos a TFBM intraoperatório e a cada 48 horas, até o período de eutanásia	O uso combinado de TFBM com BHF e MB contribuiu para o processo de reconstrução de defeitos ósseos não críticos.
Doan et al., 2020	MLS laser (ASA laser, Vicenza, Italy)	-/-	Aumentar a formação de vasos sanguíneos e reparação de tecidos depois de levantamento de seio maxilar e instalação de implantes dentários	Concentrado de fator de crescimento autólogo	As janelas do seio lateral foram criadas com o uso de PES. Os implantes foram inseridos na mesma cirurgia e envolvidos com CGF. No local, foi realizado tratamento com laser de PBM, aplicado nas regiões apical, bucal, lingual, coronal, mesial e distal da ferida cirúrgica	Brotamento vascular e fechamento da ferida foram observados após o primeiro dia. Nova formação óssea foi detectada nos seios maxilares aumentados próximos aos implantes, através de radiografias e tomografia computadorizada de feixe cônico.

Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: BHF-Biopolímero heterólogo de fibrina. TFBM-Terapia fotobiomodulada. MB-Matriz óssea bovina

A utilização de terapias combinadas que envolvem o uso de fibrina associada à terapia de fotobiomodulação tem se mostrado uma estratégia promissora para favorecer a regeneração dos tecidos lesionados, com melhor qualidade e menor tempo. Quando aplicada no local da lesão, a fibrina forma uma matriz bioativa no microambiente, exercendo efeito hemostático, além de favorecer interações entre células e biomoléculas. Esses efeitos, somados aos do PBM, constituem uma terapia coadjuvante que atua estimulando a atividade celular, a angiogênese e a síntese de colágeno e biomoléculas (Freitas et al., 2022; Colombo et al., 2021; Inchigolo et al., 2022).

A aplicação da fotobiomodulação, por meio de irradiação direta sem impactar a temperatura da superfície, utilizando laser de baixa intensidade ou laser de diodo (GaAlAs) (Rasouli, 2014), tem sido empregada para induzir a regeneração e potencializar as atividades das células ósseas, desempenhando um papel coadjuvante nesse processo. Estudos indicam que a LBI estimula a cicatrização de feridas (Luger et al., 1998) e a síntese de colágeno (Lam et al., 1982). Nesse contexto, a combinação dessa abordagem não invasiva com o uso de concentrados plaquetários surge como uma forma de terapia combinada que pode contribuir significativamente para o processo de reparo ósseo, visto que ambas as técnicas demonstram efeitos e propriedades benéficos à neoformação óssea.

3 OBJETIVOS

Esta seção compreende os objetivos estabelecidos para dar desenvolvimento a este estudo.

3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a neoformação óssea induzida pelo uso da membrana de PRF com aplicação do laser de diodo.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar qualitativamente:

Contagem de células totais

Presença de angiogênese

Área de reparo ósseo

4 METODOLOGIA

O projeto de pesquisa em questão passou por um processo de avaliação ética e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o número 5541150219, do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), da Universidade Federal da Bahia (UFBA). As cirurgias foram conduzidas no biotério de experimentação do Laboratório de Neuroimunoendocrinologia e Toxinologia do ICS/UFBA, cumprindo rigorosamente as normas éticas para o uso de animais de laboratório. Essas normas estão de acordo com a legislação vigente e as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Para o cálculo do tamanho da amostra utilizou-se o Programa Estatístico WinPep, com base em estudos que empregaram protocolos semelhantes utilizando membranas de PRF para comparar duas proporções de neoformação óssea. Os parâmetros adotados para o cálculo incluíram um nível de significância de 5%, um poder estatístico de 80% e uma proporção mínima esperada entre os grupos de 0,07. Com base nesses critérios, estabeleceu-se um tamanho mínimo de amostra de 6 ratos para cada grupo experimental.

Para a obtenção das membranas de PRF, foram necessários 12 ratos doadores e cada membrana obtida de um rato doador foi dividida em duas para serem utilizadas em dois defeitos ósseos criados. Adicionalmente, foi calculado um acréscimo de 10% no total amostral, resultando em 7 ratos adicionais. Este procedimento visou garantir uma margem adicional para eventuais perdas ou imprevistos durante o experimento. Estudos indicam que diferentes animais são utilizados para investigar o processo fisiológico de cicatrização tecidual, sendo os mamíferos os mais semelhantes aos humanos (Cohen; Mast, 1990; Padilha et al., 2018). Os ratos, devido ao baixo custo, facilidade de transporte e ocupação reduzida de espaço, são frequentemente escolhidos para esses estudos (Cohen; Mast, 1990; Lichtenfels et al., 2013).

No presente experimento, foram utilizados 66 ratos Wistar, com peso variando entre 250 e 350 g, levando em consideração perdas durante o experimento. Os animais foram obtidos no biotério SUPRILAB e foram divididos em 4 grupos, cada um composto por 12 animais; 6 animais de cada grupo experimental foram submetidos à eutanásia após 30 e 60 dias. Os grupos experimentais incluíam: D (defeito ósseo), DPRF (defeito ósseo e aplicação de PRF), DL (defeito ósseo e laserterapia), e DPRFL (defeito ósseo + PRF + laserterapia).

Os animais foram alojados em condições padrão para a espécie, no biotério de experimentação do Laboratório citado. As caixas utilizadas eram de polipropileno, com dimensões de 41x34x16,

com capacidade para 3/4 animais, fechadas com tampa de arame de aço carbono, com encaixe para bebedouros. Durante todo o período experimental, os animais foram alimentados com ração comercial para roedores e tiveram acesso irrestrito à água.

As caixas foram organizadas em estantes de aço dentro de uma sala climatizada, mantendo uma temperatura constante de 22 °C +/- 2 °C, com exaustão para controle adequado do ambiente. As condições de umidade foram mantidas em torno de 65%, seguindo um ciclo de luz de 12 horas de iluminação e 12 horas de escuridão. As gaiolas foram higienizadas regularmente, sendo lavadas com água e sabão neutro a cada dois dias, juntamente com a troca da maravalha. Os ratos foram aleatoriamente agrupados em caixas, com três animais por caixa, e separados de acordo com os grupos experimentais.

4.1 PREPARO DA MEMBRANA DE PRF

A coleta sanguínea foi realizada por meio de punção intracardiaca, utilizando um *scalp* a vácuo, diretamente no ventrículo esquerdo do animal. Coletaram-se de 5 a 8 ml de sangue de cada rato doador, com peso corporal aproximado de 350 g. Após a coleta, o tubo foi posicionado em uma centrífuga de bancada (Modelo Montserrat 80-2B15 mL®), equilibrada por peso com um tubo contendo o mesmo volume de água. As amostras de sangue foram coletadas em tubos plásticos de tampa branca, sem tratamento de sílica e sem anticoagulantes, sendo imediatamente centrifugadas a 2400 rpm por 10 minutos (Silveira et al., 2023). A escolha do tubo de plástico sem jateamento foi recomendada para evitar a cascata de coagulação precoce e impedir a rápida coagulação do sangue antes da centrifugação.

Compreendendo que o tempo de coagulação para o sangue de rato é de aproximadamente 2-5 minutos, mais rápido do que o tempo de coagulação humano de 5-10 minutos (Pertsov et al., 2022), a amostra de sangue coletada para a produção de PRF foi centrifugada, resultando no coágulo de PRF acima dos eritrócitos, localizado na porção média do tubo (Figura 1a). Posteriormente, o coágulo (Figura 1b) foi cuidadosamente removido, pressionado entre duas compressas estéreis para obter uma membrana de fibrina autóloga (Figura 1c). Cada membrana, proveniente de um rato doador, foi dividida ao meio e cada metade obtida foi dobrada ao meio para ser utilizada em um defeito ósseo criado (Figura 4 a e b).

Figura 1 – (a) Coágulo de PRF. (b) Coágulo removido. (c) Membrana de fibrina.

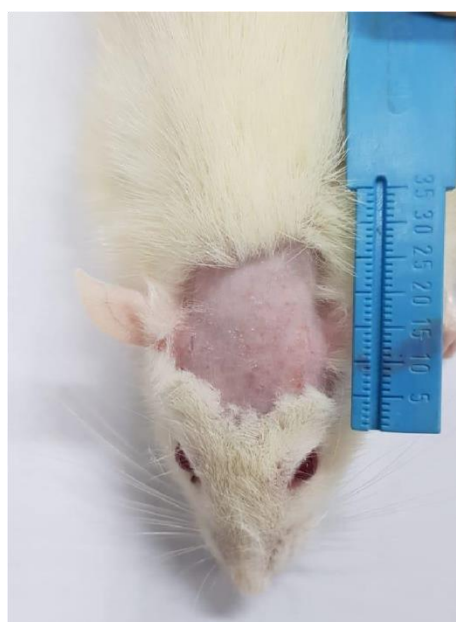


Fonte: Arquivo fotográfico da autora.

4.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas antes de serem anestesiados com ketamina a 10% (100 mg/kg) + xilazina a 2% (14 mg/kg), via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre um campo cirúrgico para realizar a tricotomia (Figura 2) na região da calvária e proceder à antisepsia da área cirúrgica com álcool iodado.

Figura 2 – Tricotomia prévia ao procedimento cirúrgico



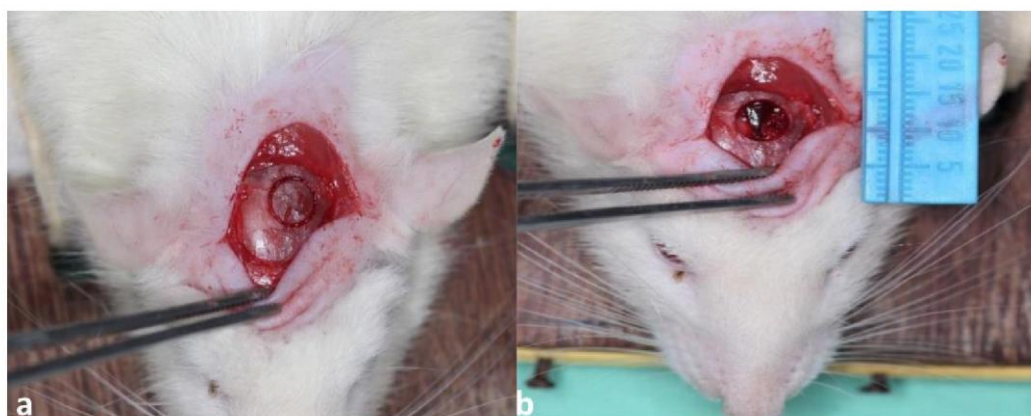
Fonte: Arquivo fotográfico da autora.

Realizou-se uma incisão semilunar entre as orelhas, com o objetivo de dificultar o acesso posterior à ferida cirúrgica por parte dos animais. A incisão cutânea e muscular teve

aproximadamente 3 cm de extensão, permitindo a exposição do tecido ósseo. Utilizou-se um cabo de bisturi n° 3 com lâmina n° 15C para realizar a incisão. Os tecidos subcutâneos e musculares foram então divulsionados. Posteriormente, o periósteo foi incisado e afastado, mantendo a visualização do campo operatório por meio de três pinças hemostáticas.

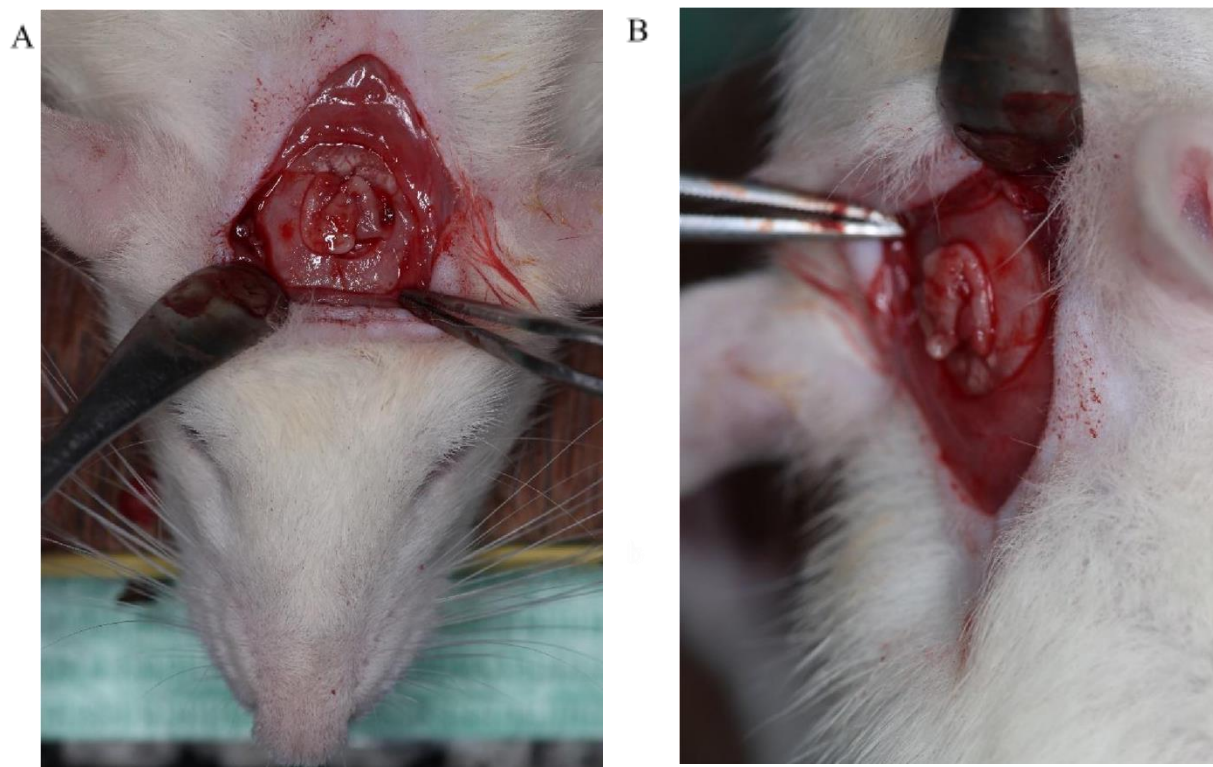
Enquanto as amostras de sangue estavam sendo centrifugadas, um defeito ósseo foi criado na porção mediana da calota craniana de cada rato, localizado entre os ossos parietais e com aproximadamente 7 mm de diâmetro (Figura 3a). Utilizou-se uma broca trefina de 6 mm de diâmetro interno (Neodent, Curitiba, PR, Brasil) montada em um contra-ângulo com redução 1:20, acionada por um motor para implantes (DrillerBLM 600 plus, SP, Brasil) a 1500 rpm. Durante o procedimento, realizou-se irrigação externa peristáltica com solução fisiológica salina 0,9%, garantindo a integridade da dura-máter (Figura 3b). Com relação aos defeitos, estes foram tratados conforme a categorização de cada grupo e os tecidos foram readaptados à posição inicial com sutura simples (pontos interrompidos), utilizando-se fio de náilon 5-0 (Procure®, SP, Brasil).

Figura 3 - (a) Defeito ósseo em calota craniana de rato. (b) Remoção de tampão ósseo preservando a dura-máter



Fonte: Arquivo fotográfico da autora.

Figura 4 – (a) e (b) – Membrana de PRF posicionada em defeito ósseo



Fonte: Arquivo fotográfico da autora.

4.3 PARÂMETROS DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LASER

O aparelho utilizado foi o TFPremier, laser de diodo infravermelho com meio ativo GaAlAs (arseneto de gálio e alumínio), com comprimento de onda de 830 nm (MM Optics Equipamentos, São Paulo). Para os grupos experimentais irradiados (DL e DPRFL 30 e 60 dias), a primeira sessão de laser ocorreu imediatamente após o procedimento cirúrgico e a cada 48 horas durante 15 dias, na energia de 0,7 joules, densidade de energia de 25 J/cm², de forma pontual, com potência de 70 mW, no modo de emissão contínua, em um tempo de aplicação de 15 segundos. O comprimento de onda escolhido é o mais utilizado, além de ter evidência que os fibroblastos saudáveis apresentaram melhor proliferação celular e síntese de colágeno quando irradiados no comprimento de onda de 635 nm + 830 nm ou 830 nm (Mãe et al. 2018).

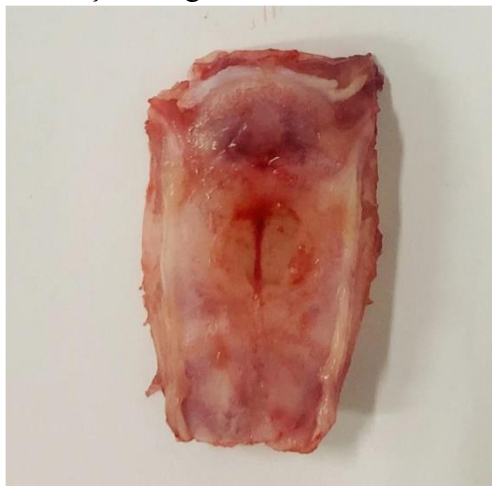
4.3 MORTE DOS ANIMAIS

Todos os grupos foram submetidos a dois momentos de eutanásia: 30 e 60 dias após os procedimentos. Os ratos foram eutanasiados por meio de uma sobredosagem de anestésico (Tiopental por via endovenosa, três vezes a dose recomendada para a anestesia geral – 30mg/Kg).

Os cortes macroscópicos foram executados pelo mesmo pesquisador nas regiões anterior aos olhos (focinho) e lateralmente às orelhas. Além desses cortes, foi efetuado um corte frontal, preservando apenas a região superior do cérebro e o crânio (Figura 5).

As peças cirúrgicas foram acondicionadas em frascos com tampa, contendo formol a 10%, em quantidade superior ao tamanho da peça, e enviadas ao Laboratório de Anatomia Patológica na Faculdade de Odontologia da UFBA.

Figura 5 – Peça cirúrgica enviada ao laboratório



Fonte: Arquivo fotográfico da autora.

4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

As peças foram fixadas em solução de formol a 10% por aproximadamente sete dias. Após a fixação, os segmentos anteriores das calvárias foram submetidos a um banho em ácido fórmico a 10% por 24 horas.

Após a descalcificação inicial, cada espécime foi dividido longitudinalmente em dois blocos, exatamente sobre o centro do defeito cirúrgico original. Os espécimes foram

processados e incluídos em parafina, passando pelos estágios de desidratação, clarificação e impregnação por parafina.

Em seguida, uma série de secções, na direção longitudinal do espécime, foi feita com 3 µm de espessura, a partir do centro do defeito cirúrgico original. Essas secções foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análise microscópica.

4.6 ANÁLISE DE DADOS

Realizaram-se avaliações descritivas e estatísticas dos dados obtidos, empregando testes estatísticos para uma probabilidade de erro de 5% ($p < 0,05$).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As imagens microscópicas foram capturadas e analisadas por um avaliador, cego para as condições experimentais, utilizando o *software* Image J-SisGET IT (versão 1.50b, National Institute Health, EUA), em conjunto com o sistema de captura (Olympus Soft Imaging Solutions, GmbH, Münster, Alemanha).

Os dados foram submetidos a uma análise estatística, utilizando-se o programa Minitab®, com um nível de significância de 5%, tanto para comparação intra quanto intergrupos. Para a análise histomorfométrica quantitativa, o *software* GraphPad Prism (versão 8.0, GraphPad Program Inc., San Diego, CA, EUA) foi empregado para descrever os resultados em gráficos. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, os testes de comparações múltiplas de Tukey e de comparações múltiplas de Dunn (para dados não paramétricos) foram utilizados como *post-hoc*. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas nos valores de p : * $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$; $< 0,0001$.

Para a mensuração do reparo formado no defeito ósseo criado, o programa Image J foi calibrado de acordo com a objetiva do microscópio em que as fotos foram tiradas. Em um aumento ocular de 4x, a distância em mm foi ajustada para a distância conhecida da câmara de Neubauer, que foi de 0.05mm, e a distância em pixels foi calculada no Image J (224.056). Em seguida, a área obtida de cada reparo por animal do grupo foi calculada

e o *software* GraphPad foi utilizado para a descrição dos resultados em gráficos, seguindo as etapas descritas anteriormente.

5 RESULTADOS

A avaliação incluiu a análise histológica e histomorfométrica de todos os grupos, após os dois períodos (30 e 60 dias) para o número total de células, angiogênese e área de reparo ósseo.

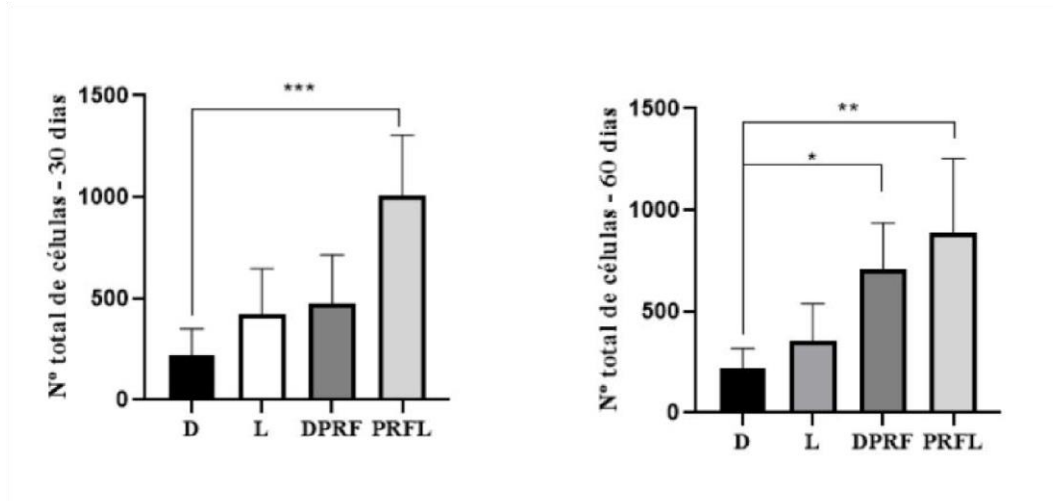
5.1 AVALIAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS ENTRE GRUPOS

Na análise comparativa entre os grupos, identificou-se uma diferença estatisticamente significativa no número total de células entre o grupo D e o grupo DPRFL. Este último demonstrou uma quantidade celular superior após 30 dias ($p < 0,001$) e 60 dias ($p < 0,01$). Ao examinar a comparação entre o grupo D e o grupo DPRF, notou-se uma prevalência significativa em favor do último grupo em ambos os períodos avaliados, com uma diferença estatisticamente mais notável ($p < 0,05$) após 60 dias.

Quando se compararam os grupos D e DL, evidenciou-se um número superior de células no grupo DL após 30 e 60 dias. Apesar de uma predominância mais acentuada após 30 dias, não foi observada diferença estatisticamente significativa em ambos os intervalos de tempo.

Esses resultados sugerem uma variação notável no comportamento celular entre os grupos, destacando-se a importância de considerar essas discrepâncias ao interpretar os dados coletados.

Figura 6 – Gráfico com comparação quantitativa do número total de células após 30 e 60 dias entre grupos **FonteF**



Fonte: Dados da pesquisa.

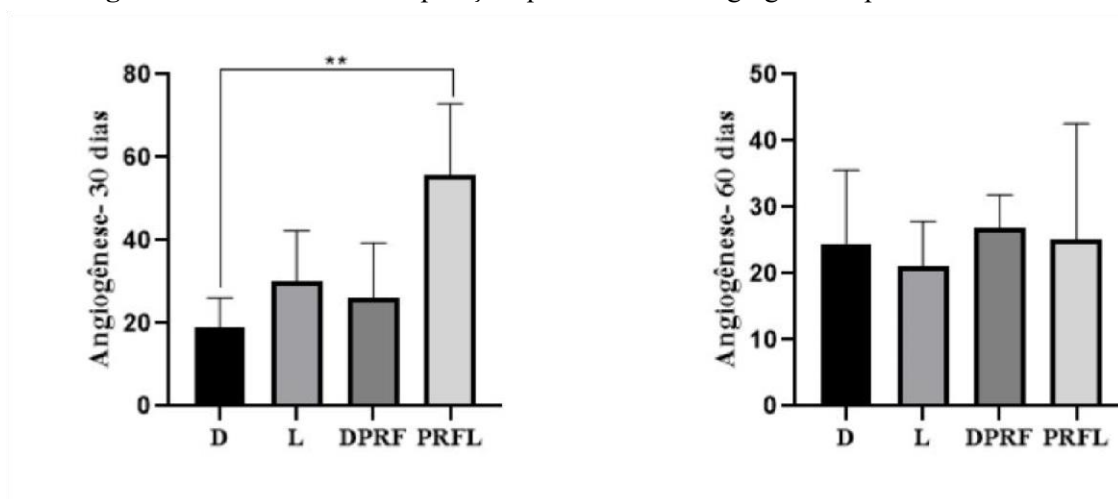
5.2 AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE ENTRE GRUPOS

Na análise da angiogênese formada nos dois períodos entre os grupos, foi evidenciada uma diferença significativamente maior ($p < 0,01$) entre o grupo D e o grupo DPRFL após 30 dias, com a expressividade sendo mais marcante no último. Ao comparar os grupos após 60 dias, notou-se um aumento da angiogênese de forma geral, sendo mais elevada no grupo PRF, porém sem diferença significativa entre eles.

É importante destacar que todos os grupos que receberam tratamento apresentaram uma angiogênese significativamente maior do que o grupo D, após 30 dias. Contudo, essa tendência não foi observada após 60 dias, quando o grupo DL demonstrou uma menor angiogênese em comparação com o grupo D.

Esses resultados apontam para variações temporais na resposta angiogênica aos diferentes tratamentos, sugerindo a necessidade de considerar a evolução temporal ao interpretar os dados relacionados à angiogênese nos grupos estudados.

Figura 7 – Gráfico com comparação quantitativa de angiogênese após 30 e 60 dias entre grupos.



Fonte: Dados da pesquisa.

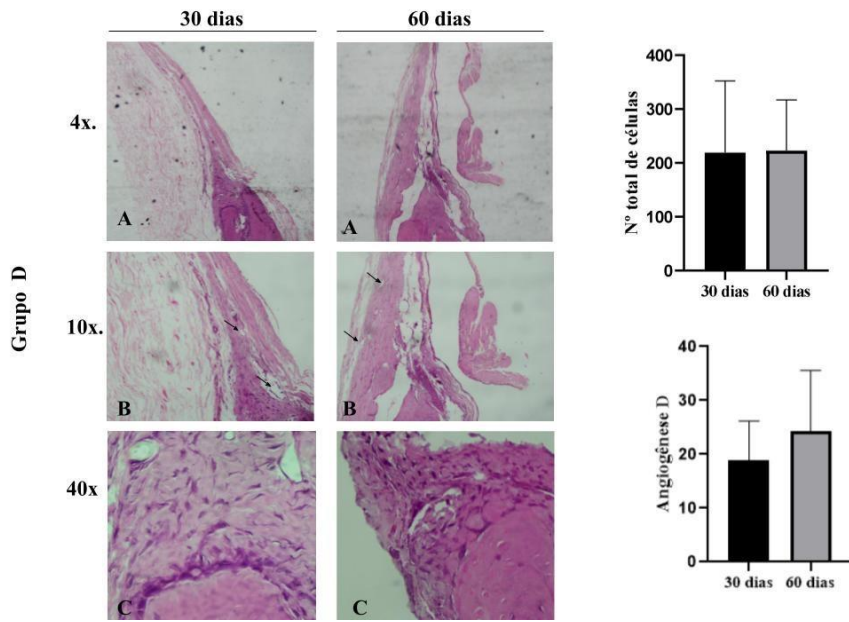
5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E QUANTITATIVA POR GRUPO

Ao examinar os gráficos e imagens dos cortes corados com H&E (Fig. 8) no grupo D após 30 e 60 dias, não foi observada diferença significativa no número total de células nos dois períodos. Contudo, foi notada uma maior angiogênese (indicada por setas) após 60 dias. No grupo DL (Figura 9), houve uma predominância celular e de angiogênese após os primeiros 30 dias. No grupo que utilizou a membrana de PRF (Figura 10), não foi observada diferença significativa na presença de angiogênese após os dois períodos, mas houve uma maior presença de células após 60 dias. Em contraste, ao associar a membrana de PRF com a laserterapia (Figura 11), observou-se uma menor quantidade celular após 60 dias e uma maior área de angiogênese após 30 dias.

Ao analisar o reparo formado no defeito ósseo criado (Figura 12), notou-se que o grupo PRFL demonstrou uma área maior de reparo do que os demais após 30 dias, o que persistiu após 60 dias, embora sem diferença estatística. Vale ressaltar que o grupo que utilizou apenas a membrana de PRF obteve uma maior área de reparo apenas quando comparado ao grupo DL após 60 dias.

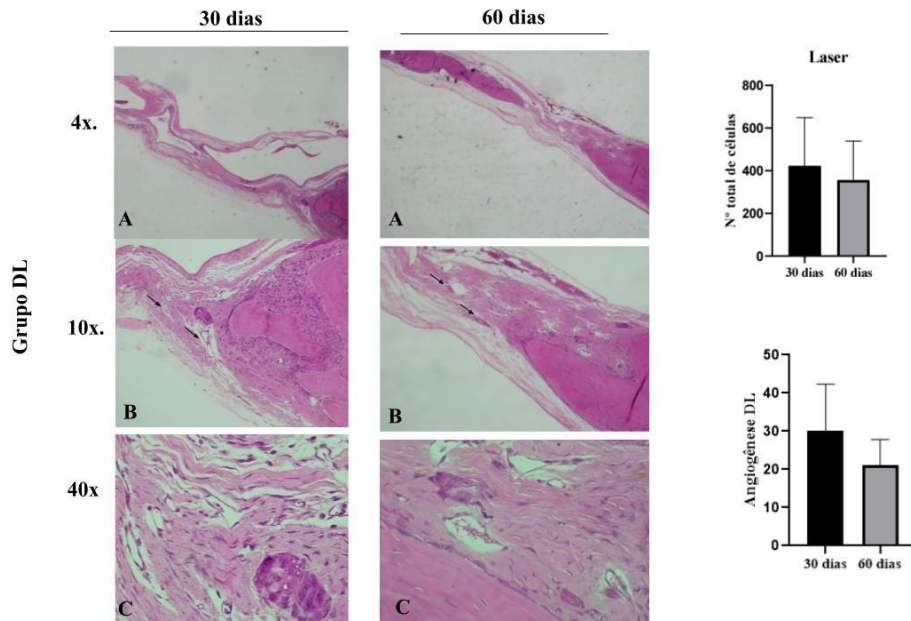
Esses resultados destacam nuances temporais e de resposta específica aos tratamentos aplicados, fornecendo *insights* valiosos para a compreensão do processo de reparo ósseo nos diferentes grupos estudados.

Figura 8 (a-c) – Grupo D- Observação histológica/gráfico comparando número de células totais e angiogênese após 30 e 60 dias.



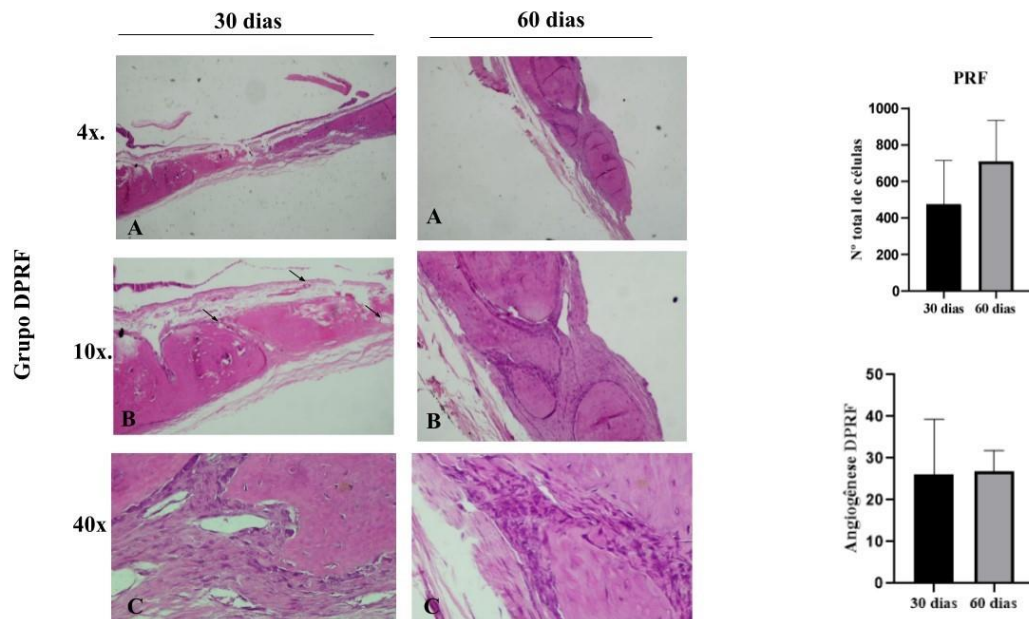
Fonte: Arquivo fotográfico da autora.

Figura 9 (a-c) – Grupo DL- Observação histológica/gráfico comparando número de células totais e angiogênese após 30 e 60 dias.



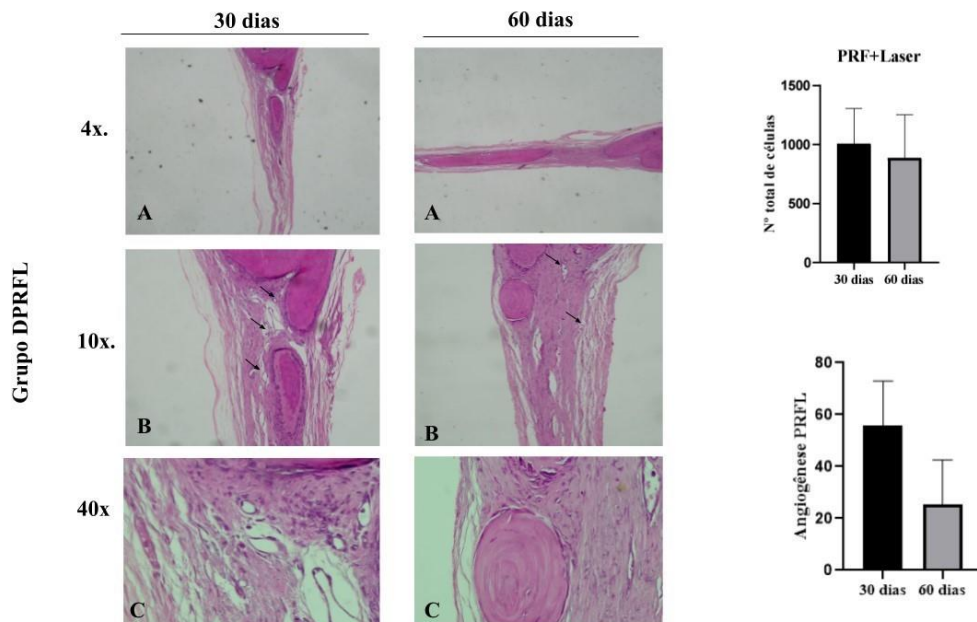
Fonte: Arquivo fotográfico da autora.

Figura 10 (a-c) – Grupo DPRF-Observação histológica/gráfico comparando número de células totais e angiogênese após 30 e 60 dias.



Fonte: Arquivo fotográfico da autora.

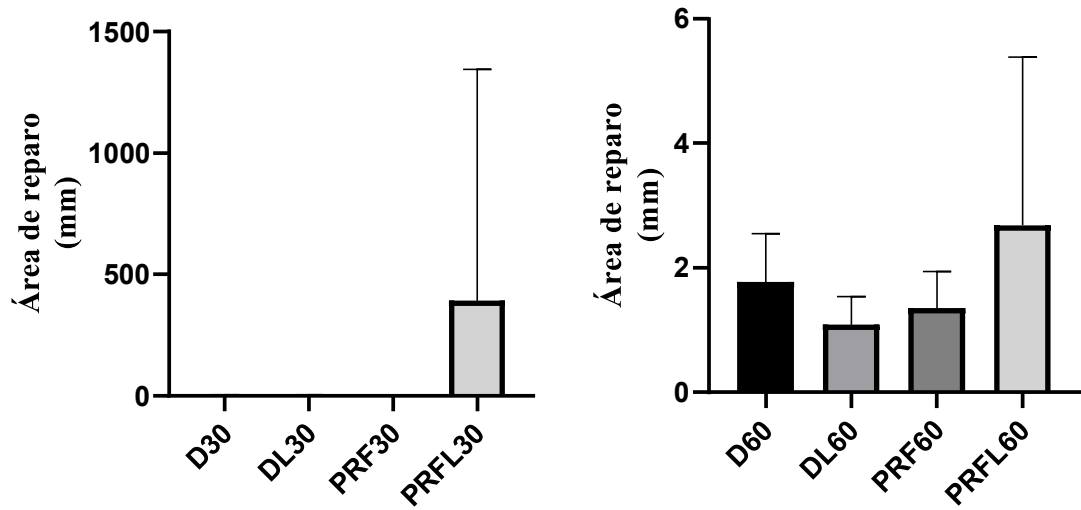
Figura 11 (a-c) – Grupo DPRFL-Observação histológica/gráfico comparando número de células totais e angiogênese após 30 e 60 dias.



Fonte: Arquivo fotográfico da autora.

Figura 12 – Gráfico com comparação da área de reparo após 30 e 60 dias entre grupos.

Análise do reparo ósseo
Análise do reparo ósseo nos grupos após 30 dias
nos grupos após 60 dias



Fonte: Dados da pesquisa.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o impacto da utilização da membrana de PRF isoladamente e em combinação com LBI em defeitos ósseos críticos na calvária de ratos. A escolha dessa região para a criação dos defeitos ósseos foi motivada pela sua anatomia favorável para manipulação durante a cirurgia e controle pós-operatório, o que reduz as chances de infecção do local cirúrgico (Padilha et al., 2018). Adicionalmente, a região é caracterizada pela ausência de estresse mecânico significativo e pela relativa estabilidade das estruturas circundantes ao defeito, devido à cobertura proporcionada pelo perióstio do crânio e pelos músculos temporais e frontais. Portanto, esse modelo oferece uma plataforma clínica relevante para avaliar terapias de regeneração óssea, contribuindo para intervenções clínicas mais eficazes. (Takagi; Urist, 1982, Schmitz; Hollinger, 1986; Wang et al., 2003; Spicer et al., 2012).

Quando observado o grupo em que não houve tratamento após cirurgia, não foi observada diferença significativa no número total de células nos dois períodos. Ao analisar o grupo que utilizou apenas a membrana de PRF, não foi observada diferença significativa na presença de angiogênese após os dois períodos, mas houve uma maior presença de células após 60 dias e obteve-se uma maior área de reparo apenas quando comparado ao grupo controle e ao grupo DL após 60 dias. Este achado está em concordância com o estudo de Kang et al. (2011), que também constatou uma melhoria na regeneração óssea em defeitos criados na calvária de ratos ao utilizar PRF.

Da mesma forma, Tajima et al. (2013) mostraram que o uso exclusivo de PRF para elevação do assoalho do seio maxilar, combinado com a instalação do implante, resultou em um aumento significativo na altura óssea, de $4,28 \pm 1,00$ mm antes da cirurgia para $11,8 \pm 1,67$ mm após a cirurgia. Em concordância, Li et al. (2013) e Oliveira et al. (2015) encontraram ganho ósseo alveolar utilizando apenas PRF, demonstrando que a fibrina tem efeito significativo na diferenciação osteogênica.

Ao introduzir a laserterapia, houve uma predominância celular e de angiogênese logo após os primeiros 30 dias, com diferença significativamente maior ($p < 0,01$) entre o grupo D e o grupo DPRFL após 30 dias, com a expressividade de reparo sendo mais marcante no grupo onde foi utilizada a membrana de PRF e laserterapia, após 30 dias, o que persistiu após 60 dias. Corroborando o presente estudo, To et al. (2019) observaram

aumento da atividade osteoblástica, quando se utilizaram coágulos de A-PRF nos alvéolos após exodontias em cães. Além disso, imunexpressões mais elevadas de marcadores da atividade dos osteoblastos, dos osteoclastos e da função vascular, como a osteocalcina e a osteopontina, foram encontradas no osso recém-formado no grupo A-PRF, em comparação ao grupo controle.

Ao avaliar a presença de angiogênese, os dois grupos em que houve tratamento com a membrana de PRF mostraram-se superiores em relação aos demais. No entanto, ao utilizar a LBI, a predominância de angiogênese foi maior após 30 dias, o que contrasta com o grupo PRF, onde observou-se maior presença de angiogênese após 60 dias, sem diferença significativa entre os grupos. Diante de tais achados, os autores Bikmulina et al., (2020) e Priglinger et al. (2018) concordam que a fotobiomodulação aliada à fibrina potencializa a melhora dos resultados, colaborando na proliferação celular e vascular.

Nos últimos anos, tem havido um aumento na busca de métodos não invasivos, como a terapia de fotobiomodulação a laser, para aprimorar o processo de reparo ósseo (Pomini et al., 2019). Neste estudo, foi empregado o laser de diodo infravermelho com meio ativo GaAlAs, operando a um comprimento de onda de 808 nm, com densidade de energia de 25 J/cm² e potência de 70 mW. Ao examinar os espécimes tratados com a laserterapia, observou-se que o grupo submetido à LBI apresentou um ganho ósseo superior apenas em comparação com o grupo controle, mas inferior aos grupos que utilizaram a membrana de PRF, após 30 e 60 dias. Esses achados estão alinhados com os de Mehdiyev et al. (2019), os quais identificaram um aumento na densidade óssea após a elevação do seio maxilar e instalação simultânea de implantes dentários utilizando a LBI, em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$).

A utilização de terapias combinadas que envolvem o uso de fibrina associada à fotobiomodulação tem se mostrado uma estratégia promissora para favorecer a regeneração dos tecidos lesionados com melhor qualidade e menor tempo. Quando aplicada no local da lesão, a fibrina forma uma matriz bioativa no microambiente que exerce efeito hemostático, além de favorecer interações entre células e biomoléculas. Esses efeitos, somados aos do laserterapia, constituem uma terapia coadjuvante que atua estimulando a atividade celular, a angiogênese e a síntese de colágeno e biomoléculas (Freitas et al., 2022), afirmando o que foi encontrado no atual estudo, onde foram observadas maior quantidade celular e presença de angiogênese ao utilizar a LBI.

Contrariamente aos resultados encontrados neste estudo, Jonasson et al. (2017) não observaram um aumento significativo na densidade óssea em defeitos críticos na calvária de ratos, tratados com concentrado plaquetário isoladamente ou em combinação com LBI. Essa disparidade nos resultados pode ser devido ao tipo de concentrado plaquetário utilizado, visto que no atual estudo foi a PRF e no estudo de Jonasson et al. (2017), o PRP.

No atual estudo, a área de reparo formada foi maior no grupo PRFL, após os dois períodos avaliados. Em análise clínica, três estudos (Bikmulina et al., 2020; Sahin et al., 2020; Sahin et al. 2021) que utilizaram PRF, combinada com fotobiomodulação para o tratamento da osteonecrose dos maxilares, todos obtiveram bons e promissores resultados para tratamento desse tipo de condição óssea.

Além de promover a proliferação e diferenciação de osteoblastos (Stein et al., 2005), a Terapia de Fotobiomodulação a Laser também demonstrou capacidade de inibir a diferenciação de osteoclastos (Xu et al., 2009) e induzir o processo de mineralização (Fukuhara et al., 2006). Por outro lado, as citocinas e os fatores de crescimento presentes na membrana de fibrina rica em plaquetas (PRF) têm sido associados à aceleração da migração celular e à resposta inflamatória, o que pode promover ainda mais a reparação tecidual (Messora et al., 2007).

A utilização da membrana de PRF tem sido correlacionada com uma aceleração do processo de reparo ósseo e uma diminuição da reabsorção do osso alveolar (Choukroun et al., 2006; Temmerman et al., 2016). Além disso, foi observado previamente o efeito biomodulador da LBI na regeneração óssea em várias circunstâncias experimentais (Sleem et al., 2019; Padilha et al., 2018; Arakeeb et al., 2019). Dessa forma, pode-se perceber que poucos estudos utilizaram a associação fibrina ao/ou com LBI, mas, devido aos bons resultados, a técnica mostra-se promissora, com potencial para colaborar na reparação tecidual. A dificuldade em comparar os diferentes tipos de fotobiomodulação pode ser considerada uma limitação, devido aos diferentes protocolos relatados nos experimentos.

Preocupações sobre a coleta de amostras sanguíneas animais foram levantadas por Dohan et al. (2010), destacando o tempo entre a coleta e a centrifugação como um fator crucial no protocolo da PRF. Esses autores investigaram o uso de tubos de vidro e plástico com jateamento interno, concluindo que tubos plásticos jateados não parecem afetar a

arquitetura da membrana de fibrina. No entanto, no presente estudo, o método utilizado diferiu em relação à natureza desses tubos, os quais foram tubos plásticos sem jateamento interno de sílica, com o objetivo de evitar a formação precoce do coágulo de fibrina e impedir a rápida coagulação do sangue antes da centrifugação (Silveira et al., 2023). Portanto, para garantir a coleta sanguínea dentro do tempo estabelecido pelo protocolo, as amostras foram obtidas por punção intracardiaca.

Quanto à natureza da membrana de fibrina, o estudo de Oliveira et al. (2015) não encontrou diferença significativa entre o grupo de ratos que utilizou membrana autóloga de PRF em defeitos críticos na calvária e o grupo que utilizou membrana de PRF homóloga. Isso sugere que o uso de membrana homóloga de PRF não seria uma limitação para este estudo.

Limitações deste estudo incluem o tamanho da amostra, a perda de dois animais do grupo experimental PRFL e a falta de padronização dos protocolos terapêuticos utilizados. Até o momento, não existe um protocolo definido para a aplicação da LBI em defeitos ósseos críticos, nem para o método de obtenção da membrana de PRF em ratos. Embora este estudo tenha demonstrado que o uso de tubos plásticos sem jateamento interno de sílica aparentemente não afetou a arquitetura da membrana de PRF, pode haver impacto nos fatores de crescimento. Diferentes técnicas de obtenção têm sido descritas na literatura para aumentar a quantidade de fatores de crescimento na rede de fibrina, tanto em estudos com humanos quanto em animais.

Em relação ao uso da LBI, é reconhecido que outros fatores, como a fase de crescimento celular (Osawa et al., 1998), a frequência e o número de sessões (Silva Júnior, 2002) também exercem influência. Essas considerações devem ser levadas em conta ao interpretar-se os resultados deste estudo e ao planejar pesquisas futuras sobre o tema.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados, notou-se que os grupos que receberam tratamento com a membrana de PRF mostraram uma maior predominância no quantitativo celular e na presença de angiogênese, após 30 e 60 dias, em comparação aos demais grupos. A área de reparo observada foi maior no grupo PRFL após 30 dias e não houve diferença significativa entre os grupos, especialmente após 60 dias.

Esses resultados indicam a necessidade de desenvolver estudos mais aprofundados para investigar protocolos específicos do uso da Terapia a Laser de Baixa Intensidade e a obtenção da Fibrina Rica em Plaquetas (PRF), avaliando suas propriedades de maneira cuidadosa. Essa abordagem pode fornecer insights valiosos para otimizar a combinação dessas terapias visando a uma regeneração óssea mais eficaz em contextos clínicos.

REFERÊNCIAS

- Abdullah WA. Evaluation of bone regenerative capacity in rats claverial bone defect using platelet rich fibrina with and without beta tri calcium phosphate bone graft material. *Saudi Dent J.* 2016;28(3):109-17.
- Almeida JM et al. Influence of lowlevel laser therapy on the healing process of autogenous bone block grafts in the jaws of systemically nicotine-modified rats: a histomorphometric study. *Arch Oral Biol.* 2017; 75:21–30.
- Altan AB, Bicakci AA, Avunduk MC, Esen H. The effect of dosage on the efficiency of LLLT in new boné formation at the expanded suture in rats. 2015; 30(1): 255-62.
- Alzahrani AA, Murriky A, Shafik S. Influ-ence of platelet rich fibrin on post-extraction socket healing: a clinical and radiographic study. *Saudi Dent J.* 2017; 29:149–55.
- Amid R, Kadkhodazadeh M, Ahsaie MG, Hakakzadeh A. Effect of low level laser therapy on proliferation and differentiation of the cells contributing in bone regeneration. *J Lasers Med Sci.* 2014; 5(4):163
- Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed. Laser Surg.* 2015, 33, 183–4.
- Arakeeb MAA, Zaky AA, Harhash TA, Salem WS, El-Mofty M. Effect of combined application of growth factors and diode laser bio-stimulation on the osseo integration of dental implants. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019. 15; 7(15): 2520–7.
- Basford JR. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med.* 1995. 16:331-42.
- Basford, JR. Low intensity laser therapy: Still not an established clinical tool. *Lasers Surg. Med.* 1995; 16 (4) 331–42.
- Batista PSC, Sant’ana Filho, Manoel. Avaliação microscópica do processo de reparo em cavidades ósseas submetidas a implante de osso liofilizado bovino. [s.n.t]
- Belkin M, Schwartz M. New biological phenomena associated with laser radiation. *Health Physics.* 1989; 56(5): 687-90.
- Bikmulina PY, Kosheleva NV, Shpichka AI, Efremov YM, Yusupov VI, Timashev os, Rochev YA. Beyond 2D: efeitos da fotobiomodulação em sistemas 3D semelhantes a tecidos. *J. Biomédica. Optar.*2020,25, 048001.
- Bosshardt DD, Bornstein MM, Carrel JP, Buser D, Bernard JP. Maxillary sinus graft-ing with a synthetic, nanocrystalline hy-droxyapatite-silicagel in humans: histologic and histomorphometric results. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2014; 34:259–67.
- Brawn PR, Kwong-Hing A. Histologic comparison of light emitting diode phototherapy-treated hydroxyapatite-grafted extraction sockets: a same-mouth case study. *Implant Dent.* 2007;16(2):204–11.
- Buchaim DV, Andreo JC, Pomini KT, Barraviera B, Ferreira RS, Duarte MAH, Alcalde MP, Reis CHB, Bortoli Teixeira D, Souza Bueno CR et al. A biocomplex to repair experimental critical size defects associated with photobiomodulation therapy. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 2022; 28:1–14.

- Castro AB et al. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and metaanalysis. *J Clin Periodontol.* 2017;44(1):67–82.
- Castro AN, Meschi A, Temmerman et al. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part B: sinus floor elevation, alveolar ridge preservation and implant therapy. A systematic review, *Journal of Clinical,* 2017;44 (2): 225-34.
- Choi K et al. Low-level laser therapy promotes the osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells seeded on an acellular dermal matrix, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2013;101(6):919–28.
- Choukroun J et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101:299–303.
- Choukroun J, Adda F, Shoeffler C, Vervelle A. Uneopportunité en paro-implantologie: le PRF. *Implantodontie.* 2001;42:55-62.
- Christensen, K. et al. Autologous platelet gel: an in vitro analysis of platelet-rich plasma using multiple cycles. *J. Extra Corpor. Technol.* 2006; 38,249–53.
- Clark D et al. Advanced platelet-rich fibrin and freeze-dried bone allograft for ridge preservation: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2018;89(4):379–87.
- Cobb CM, Low SB, Coluzzi DJ. Lasers and the treatment of chronic periodontitis. *Dent Clin North Am.* 2020;54:35-5
- Cohen, I. K.; Mast, B. A. *Models of Wound Healing. The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care.* 1990;30:149–54.
- Colombo E, Signore A, Aicardi S, Zekiy A, Utyuzh A, Benedicenti S, Amaroli A. Aplicações experimentais e clínicas da fotobiomodulação vermelha e infravermelha próxima na disfunção endotelial: uma revisão. *Biomedicamentos.* 2021;9:274.
- Comarck DH. *Histologia.* 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1991.
- Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol.* 1996;23(5):492–6.
- Della Coletta BB, Jacob TB, Moreira LA C, Pomini KT, Buchaim DV, Eleutério RG, Pereira ESBM, Roque DD, Rosso MPdO, Shindo JVTC et al. Photobiomodulation therapy on the guided bone regeneration process in defects filled by biphasic calcium phosphate associated with fibrin biopolymer. *Molecules.* 2021;26:847.
- Dohan DM et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101:37–44.
- Dohan EDM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrie JB. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J. Periodontol.* 2010;81(4):546-55.
- Dohan Ehrenfest, David M. How to optimize the preparation of leukocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF, Choukroun's technique) clots and membranes: introducing the PRF box. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology.* 2010;110(3):275-8.

- Dragonas P, Katsaros T, Avila-Ortiz G, Chambrone L, Schiavo JH, Palaiologou A5. Effects of leukocyte–platelet- rich fibrin (L-PRF) in different intraoral bone grafting procedures: a systematic review *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2019;48(2):250-62.
- Eshghpour M, Dastmalchi P, Nekooei AH, Nejat A. Effect of platelet-rich fibrin on frequency of alveolar osteitis following mandibular third molar surgery: a double-blinded randomized clinical trial. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72:1463–7.
- Freitas Dutra J E, Hidd SMCM, Amaral MM, Filho ALMM, Assis L, Ferreira RS, Barraviera B, Martignago CCS, Figueredo-Silva J, Oliveira RA et al. Tratamento da lesão parcial do tendão calcâneo com biopolímero heterólogo de fibrina e/ou fotobiomodulação em ratos. *Lasers Med. Ciência.* 2022;37:971–81.
- Freitas NC et al. Evaluation of photobiomodulation therapy associated with guided bone regeneration in critical size defects. *In vivo study. J. Appl. Oral Sci.* 2017;26.
- Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response. *J Periodontol.* 2017;88:112–21.
- Fukuhara E, Goto T, Matayoshi T, Kobayashi S, Takahashi T. Optimal low-energy laser irradiation causes temporal G2/Marrest on rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* 2006;79(6):443–50.
- Galav S, Chandrashekar KT, Mishra R, Tripathi V, Agarwal R, Galav A. Comparative evaluation of platelet-rich fibrin and autogenous bone graft for the treatment of infrabony defects in chronic periodontitis: Clinical, radiological, and surgical reentry. *Indian J Dent Res.* 2016;27(5):502-7.
- Gassling V et al. Comparison of two different absorbable membranes for the coverage of lateral osteotomy sites in maxillary sinus augmentation: a preliminary study. *J Craniomaxillofac Surg.* 2013; 41:76–82.
- Gassling V, Douglas T, Warnke PH, Acil Y, Wiltfang J, Becker ST. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:543–9.
- Gassling V, Hedderich J, Acil Y, Purcz N, Wiltfang J, Douglas T. Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24:320–8.
- Ghahroudi AAR et al. Effect of low-level laser therapy irradiation and Bio-Oss graft material on the osteogenesis process in rabbit calvarium defects: a double blind experimental study, *Lasers Med. Sci.* 2014;29(3):925–32.
- Ghanaati S et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol.* 2014;40:679–89.
- Ghiasi MS, Chen J, Vaziri A, Rodriguez EK, Nazarian. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. *Bone Rep.* 2017; 16(6):87-100.
- Gibble JW, Ness PM. Fibrin glue: The perfect operative sealant? *Transfusion,* 1990;30(8): 741-7.

- Goulart CS, Nouer PRA, Martins LM, Garbin IU, Lizarelli RFZ. Photoradiation and orthodontic movement: experimental study with canines. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24:192–6.
- Gross AJ, Jelkmann W. Helium-neon laser irradiation inhibits the growth of kidney epithelial cells in culture. *Lasers Surg Med.* 1990;10:40-1.
- Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006 Dec;1092:385-96.
- Hamad SA, Naif JS, Abdullah MA. Effect of diode laser on healing of tooth extraction socket: an experimental study in rabbits. *J Maxillofac Oral Surg.* 2016;15(3):308–14.
- Hamblin, M.R. Photobiomodulation or low-level laser therapy. *J. Biophotonics* 2016; 9: 1122–4.
- Han M, Fang H, Li QL, Cao Y, Xia R, Zhang ZH. Effectiveness of laser therapy in the management of recurrent aphthous stomatitis: a systematic review. *Scientifica (Cairo)* 2016;906-2430.
- Hoaglin DR, Lines GK. Prevention of localized osteitis in mandibular third-molar sites using platelet-rich fibrin. *Int J Dent.* 2013;2013:875.
- Huang YY, Chen AC-H, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response.* 2009;7(4):358–83.
- Huertas RM, Luna-Bertos ED, Ramos-Torrecillas J, Leyva FM, Ruiz C, Garcia-Martinez O. Effect and clinical implications of the low-energy diode laser on bone cell proliferation. *Biol Res Nurs.* 2014;16(2):191.
- Inchingolo F, Hazballa D, Inchingolo A, Malcangi G, Marinelli G, Mancini A, Maggiore M, Bordea I, Scarano A, Farronato M, Tartaglia G, Lorusso F, Inchingolo A, Dipalma G. Innovative concepts and recent breakthrough for engineered graft and constructs for bone regeneration: A literature systematic review. *Materials, Basel,* 2022;15(3):1120. Doi 10.3390/ma15031120.
- Jahani-Sherafat S, Mokmeli S, Rostami-Nejad M, Razzaghi Z, Tavirani MR, Razzaghi M. The effectiveness of photobiomodulation therapy (Pbmt) in COVID-19 infection. *J. Lasers Med. Sci.* 2020; 11:S23–S29.
- Jonasson TH et al. Effects of low-level laser therapy and platelet concentrate on bone repair: Histological, histomorphometric, immunohistochemical, and radiographic study. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45(11):1846-53.
- Kang YH et al. Platelet-rich fibrin is a bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue Eng A.* 2011;17:349–59.
- Karayürek F et al. Combining platelet rich fibrin with different bone graft materials: an experimental study on the histopathological and immunohistochemical aspects of bone healing. *J Craniomaxillofac Surg.* 2019;47(5):815-25.
- Karu TI, Pyatibrat LV, Kolyakov SF, Afanasyeva NI. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *J Photochem Photobiol B.* 2005;81(2):98–106.
- Karu TI. Photobiology of low-power laser effects. *Health Physics.* 1989;56(5):691-704.

Khadra M, Kasem N, Haanaes HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97:693–700.

Kitayama S, Wong LO, Ma L, Hao J, Kasugai S, Lang NP et al. Regeneration of rabbit calvarial defects using biphasic calcium phosphate and a strontium hydroxyapatite-containing collagen membrane. *Clin Oral Implants Res.* 2015;27(12):206-14.

Kobayashi E et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig.* 2016;20:2353–60.

Kobayashi E, Fluckiger L, Fujioka-Kobayashi M et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig.* 2016;20:2353–60.

Kubesch A, Barbeck M, Al-Maawi S, Orlowska A, Booms PF, Sader RA et al. A low-speed centrifugation concept leads to cell accumulation and vascularization of solid platelet-rich fibrin: an experimental study in vivo. *Platelets.* 2018;1–12.

Kumar YR et al. Platelet-rich fibrin: the benefits. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2016; 54:57–61.

Lam TS, Abergel RP, Meeker CA, Castel JC, Dwyer RM, Uitto J. Laser stimulation of collagen synthesis in human skin fibroblast cultures. *Lasers Life Sci.* 1982;1:61–77.

Li Q et al. Platelet-rich fibrin promotes periodontal regeneration and enhances alveolar bone augmentation. *Biomed Res Int.* 2013.

Lichtenfels M, Colomé L, Sebben AD, Braga-Silva J. Effect of platelet rich plasma and platelet rich fibrin on sciatic nerve regeneration in a rat model. *Microsurgery.* 2013;33(5):383–90.

Litvinov RI, Pieters M, Lange-Loots Z, Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. In: *Macromolecular protein complexes III: Structure and function subcellular biochemistry*; Berlin: Springer, 2021; p. 471–501

Lourenço ES, Mourão CFAB, Leite PEC, Granjeiro JM, Calasans-Maia MD, Alves GG. The *in vitro* release of cytokines and growth factors from fibrin membranes produced through horizontal centrifugation. *J Biomed Mater Res A.* 2018;106(5):1373-80.

Luger EJ, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekel S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers Surg Med.* 1998; 22:97–102.

Mackie, EJ. Osteoblasts: Novel roles in orchestration of skeletal architecture. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2003;35:1301-5.

Mãe H, Yang J-P, Bronzeado RK, Lee HW, Han S-K. Efeito da terapia a laser de baixa intensidade na proliferação e síntese de colágeno de fibroblastos humanos *in vitro*. *J. Gerenciamento de Feridas. Res.* 2018;141–6.

Maitland ME, Arsenault LA, A correlation between the distribution of biological apatite and amino acid sequence of type I collagen. *Calcified Tissue International*, 1991;48(5): 341-52.

Matras HD. Wirkungen verschiedener Fibrinpräparate auf Kontinuität-störungen der Rattenhaut. *Osterr. Z. Stomatol.* 1970;67:33859.

- Mehdiyev I, Gülsen U, Sentürk FM, Sayan, NB. Radiographic evaluation of low-level laser therapy-enhanced maxillary sinus augmentation with simultaneous dental implant placement. *Ann Maxillofac Surg.* 2019;9(1):48–52.
- Messori MR et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontol Res.* 2007;43(2):217–23.
- Migliario M, Pittarella P, Fanuli M, Rizzi M, Renò F. Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. *Lasers Med Sci.* 2014; 29(4):1463–7.
- Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Hernandez M, Choukroun J. Platelet-rich fibrin and soft tissue wound healing: a systematic review. *Tissue Eng Part B Rev* 2017;23(1):83–99.
- Miron RJ, Zhang YF. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *J Dent Res.* 2012; 91:736–44.
- Monea A, Beresescu G, Boeriu S, Tibor M, Popsor S, Antonescu DM. Erratum to: bone healing after low-level laser application in extraction sockets grafted with allograft material and covered with a resorbable collagen dressing: a pilot histological evaluation. *BMC Oral Health.* 2016;16:16.
- Moraschini V, Barboza E S P. (2016). Use of platelet-rich fibrin membrane in the treatment of gingival recession: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontology.* 2016; 87:281-90. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.150420>.
- Moussa M, El-Dahab OA, El Nahass H. Anterior maxilla augmentation using palatal bone block with platelet-rich fibrin: a controlled trial. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2016; 31:708–15.
- Nacopoulos C, Dontas I, Lelovas P, Galanos A, Vesalas A-M, Raptou P, Michael Mastoris, Eustathios Chronopoulos, Nikolaos Papaioannou. Enhancement of Bone. Platelet-Rich Fibrin and Synthetic Graft. 2014. *The Journal of craniofacial surgery* 25(6).DOI:10.1097/SCS.0000000000001172
- Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A and Binderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *Journal of Oral Rehabilitation.* 2006; 33(8):619-924.
- Noba C et al. Laser for bone healing after oral surgery: systematic review. *Lasers in Medical Science.* 2018;3(3):667-74.
- Oliveira CTB de, Leonel BC, Oliveira AC de, Paiva M de B, Ramos J, Barraviera B, Ferreira Junior RS, Shimano AC. Effects of fibrin sealant and bone fragments on defect regeneration performed on rat tibiae: An experimental study. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* 2020;104:103662
- Oliveira Gonçalves JB, Buchaim DV, Souza Bueno CR, Pomini KT, Barraviera B, Júnior RSF, Andreo JC, Castro Rodrigues A, Cestari TM, Buchaim RL Effects of low-level laser therapy on autogenous bone graft stabilized with a new heterologous fibrin sealant. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2016;162:663–8.
- Oliveira LSS, Araujo AA, Araujo Junior RF, Barboza CAG, Borges BCD, Silva JSP. Low level laser therapy (780 nm) combined with collagen sponge scaffold promotes repair of rat cranial critical-size defects and increases TGF-beta, FGF-2, OPG/RANK and osteocalcin expression. *Int J ExpPathol.* 2017;98(2):75-85.

- Oliveira MR, Silva A de C, Ferreira S, Avelino CC, Garcia IR Jr, Mariano RC. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2015;44(5):649–55.
- Osawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-power laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone.* 1998; 22:347-54.
- Ozgul O et al. Efficacy of platelet rich fibrin in the reduction of the pain and swelling after impacted third molar surgery: randomized multicenter split-mouth clinical trial. *Head Face Med.* 2015;11:37.
- Padilha WSM et al. 2018. Histologic evaluation of leucocyte- and platelet-rich fibrin in the inflammatory process and repair of noncritical bone defects in the calvaria of rats. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2018;33(6):1206-12.
- Pertsov SS, Abramova Y, Chekhlov VV. Effect of repeated stress exposures on the blood cytokine profile in rats with different behavioral parameters. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2022;172:397–401.
- Pinheiro AL et al. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. *Braz. Dent. J.* 2003;14(3).
- Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg.* 2006;24:169–78.
- Pinheiro ALB, Brugnera Junior A, Zanin FAP. (Org.). *Aplicação do laser na odontologia.* São Paulo: Ed. Santos; 2010. p. 77-89
- Pluemsakunthai W, Kuroda S, Shimokawa H, Kasugai S. A basic analysis of platelet-rich fibrin: distribution and release of platelet-derived growth factor- BB. *Inflammation Regenerat* 2013;33:164-72.
- Pomini KT et al. Fibrin sealant derived from human plasma as a scaffold for bone grafts associated with photobiomodulation therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;10:20(7).
- Prados-Frutos JC, Rodriguez-Molinero J, Prados-Privado M, Torres JH, Rojo R. Lack of clinical evidence on low-level laser therapy (LLLT) on dental titanium implant: a systematic review. *Lasers Med Sci.* 2016;31(2):383–92.
- Priglinger E, Maier J, Chaudary S, Lindner C, Wurzer C, Rieger S, Redl H, Wolbank S, Dungal P. Fotobiomodulação de células da fração vascular estromal derivadas de tecido adiposo humano recentemente isoladas por diodos emissores de luz pulsados para aplicação clínica direta. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Jun;12(6):1352-62. doi: 10.1002/term.2665.
- Rasouli Ghahroudi AA et al. Effect of low-level laser therapy irradiation and Bio-Oss graft material on the osteogenesis process in rabbit calvarium defects: a double blind experimental study. *Lasers Med Sci.* 2014;29(3):925-32.
- Reddy MSB, Ponnamma D, Choudhary R, Sadasivuni KK. A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds. *Polymers* 2021;13:1105.
- Renno AC, McDonnell PA, Crovace MC, Zanotto ED, Laakso L. Effect of 830 nm laser phototherapy on osteoblasts grown in vitro on Biosilicate scaffolds. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(1):131-3.
- Romao MM, Marques MM, Cortes AR, Horliana AC, Moreira MS, Lascala CA. Microcomputed tomography and histomorphometric analysis of human alveolar bone

- repair induced by laser phototherapy: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 44(12):1521-8.
- Şahin O, Tártaro B, Ekmekcioğlu C, Aliyev, T, Odabaşı O. Prevenção da osteonecrose da mandíbula relacionada a medicamentos após cirurgia dentoalveolar: a experiência de uma instituição. *J. Clin. Exp. Dente.* 2020;12:e771–e6.
- Şahin O, Akan E, Tártaro B, Ekmekcioğlu C, Ünal N, Odabaşı O. Abordagem combinada para tratamento de estágios avançados de osteonecrose relacionada a medicamentos em pacientes maxilares. *Braz. J. Otorrinolaringol.* 2021;88:613–20.
- Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1997;111:525–32.
- Sattayut S, Hughes F, Bradley P. 820 nm Gallium aluminum ar-senide laser modulation of prostaglandin E2 production in interleukin I stimulated myoblasts. *LASER Ther.* 1999;11(2):88- 95.
- Schaffer M, Bnel H, Sroka R et al. Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). *J. Photobiol.* 2000;54:55-60
- Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clin Orthop Relat Res.* 2015;473(5):1635–43
- Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1986;205:299–308.
- Schwartz-Filho HO, Reimer AC, Marcantonio C, Marcantonio E Jr, Marcantonio RAC. Effects of low-level laser therapy (685nm) at different doses in osteogenic cell cultures. *Lasers Med Sci.* 2011;26:539–43.
- Seifi M, Shafeei HA, Daneshdoost S, Mir M. Effects of two types of low-level laser wavelengths (850 and 630nm) on the orthodontic tooth movements in rabbits. *Lasers Med Sci.* 2007; 22:261–4.
- Shakouri SK, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci.* 2010;25(1):73-7.
- Sherif A, Saleh, AB, Hesham A. Platelet-rich fibrin in maxillary sinus augmentation: A systematic review. *Journal of Oral Implantology,* 2015;41(6):746-53.
- Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, Turek TJ, Wozney JM, Wikesjö UME. Periodontal repair in dogs: recombinant bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodontol.* 1995; 66:131-8.
- Silva AP, Petri AD, Crippa GE, Stuani AS, Stuani AS, Rosa AL, Stuani MB. Effect of lowlevel laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Lasers Med Sci.* 2012;27(4):777–83.
- Silva Júnior AN, Pinheiro ALB, Oliveira MG, Weismann R, Ramalho LM, Nicolau RA. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: na experimental animal study, *J Clin Laser Med Surg.* 2002;20:83-7.
- Silveira BBB, Filho JMP, Martinez EF. Protocolo de produção de fibrina rica em plaquetas a parte da espécie *Rattus norvegicus albinus* (linhagem Wistar) para manipulação laboratorial – nota técnica. *Contemporary Journal,* 2023; 3(3):1257-67.

- Sleem SSMEB, Zayet MK, El-Ghareeb TI. Evaluation of the bio-stimulatory effect of platelet rich fibrin augmented by diode laser compared to platelet rich fibrin alone on dental implant replacing posterior mandibular teeth. Randomised Clinical Trial: Split Mouth Study. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;14:7(5): 869–75.
- Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(2):161–6.
- Stein E et al. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr*. 2008; 120(3-4):112–7.
- Suttapreyasri S, Leepong N. Influence of platelet-rich fibrin on alveolar ridge preservation. *J Craniofac Surg*. 2013; 24:1088–94.
- Tajima N, Ohba S, Sawase T, Asahina I. Evaluation of sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using platelet- rich fibrin as sole grafting material. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013;28:77-83.
- Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann. Surg*. 1982;196:100–9.
- Thalaimalai DBR, Victor DJ, Prakash PSG, Subramaniam S, Cholan PK. Effect of low-level laser therapy and platelet rich fibrin on the treatment of intra-bony defects. *J. Lasers Med. Sci*. 2020;11:456–63
- Temmerman A et al. The use of leucocyte and platelet-rich fibrin in socket management and ridge preservation: a split-mouth, randomized, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2016; 43:990–9.
- To M, Su CY, Hidaka K, Okudera T, Matsuo M. Effect of advanced platelet-rich fibrin on accelerating alveolar bone formation in dogs: a histological and immunofluorescence evaluation. *Anat Sci Int*. 2019;94(3):238-44.
- Tsirogianni AK, Moutsopoulos NM, Moutso-poulos HM. Wound healing: immunological aspects. *Injury*. 2006;37(Suppl 1):5–12.
- Uyanik LO, Bilginaylar K, Etikan I. Effects of platelet-rich fibrin and Piezosurgery on impacted mandibular third molar surgery outcomes. *Head Face Med*. 2015;11:25.
- Vilar R, Fish R.J, Casini A, Neerman-Arbez, M. Fibrinogen in human disease: Both friend and foe. *Haematologica*. 2020,105:284–96.
- Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part I. Soft tissue applications. *Aust Dent J*. 1997;42:247-54.
- Wang X, Pang Y, Ku G, Xie X, Stoica G, Wang LV. Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain. *Nat Biotechnol* 2003 Jul;21(7):803-6. doi: 10.1038/nbt839. Epub 2003 Jun 15.
- Xu M et al. Low-intensity pulsed laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarial cells. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(2):309–15.
- Yilmaz D, Dogan N, Ozkan A, Sencimen M, Eren B Mutlu I. Effect of platelet rich fibrin and beta tricalcium phosphate on bone healing. A histological study in pigs. *Acta Cirúrgica Bras*. 2014; 29(1):59–65.
- Zaky AA, El Shenawy HM, Harhsh TA, Shalash M, Awad NM. Can low level laser therapy benefit bone regeneration in localized maxillary cystic defects? - a prospective randomized control trial. *Open Access Maced J Med Sci*. 2016;4(4):720–5.

Zhang Y, Tangl S, Huber CD, Lin Y, Qiu L, Rausch-Fan X. Effects of Choukroun's plate-let-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: a histological and histomorphometric study. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012;40:321-8.

ANEXO – Aprovação da Comissão de Ética o Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS/UFBA)



Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências da Saúde - UFBA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação comparativa da membrana de colágeno e de PRF irradiadas com laser de diodo em defeito ósseo: Estudo em modelo experimental em ratos", protocolada sob o CEUA nº 5541150219, sob a responsabilidade de **Tania Tavares Rodriguez** e equipe; *Luciana Maria Pedreira Ramalho; Lorena Ferraz Santos Silva* - 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 Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde) (CEUA/ICS.UFBA) na reunião de 22/02/2019.

We certify that the proposal "Comparative evaluation of collagen membrane and PRF irradiated with diode laser in bone defect: Study in experimental model in rats", utilizing 91 Heterogenics rats (91 males), protocol number CEUA 5541150219, under the responsibility of **Tania Tavares Rodriguez** and team; *Luciana Maria Pedreira Ramalho; Lorena Ferraz Santos Silva* - 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 Federal University of Bahia (Health Sciences Institute) (CEUA/ICS.UFBA) in the meeting of 02/22/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [04/2019](#) a [12/2019](#)

Área: [Ciências da Saúde](#)

Origem: [SUPRILAB SUPRIMENTO DE LABORATORIO E BIOTERIO LTDA](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [2 a 3 meses](#)

N: [91](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [250 a 350 g](#)

Local do experimento: Biotério de experimentação do Laboratório de Neuro-imunoendocrinologia e Toxinologia

Salvador, 22 de fevereiro de 2019

Dra. Luciana Lyra Casais-e-Silva

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)

MSc. Marcos Borges Ribeiro

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)