



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA

JHONATAN THIAGO LACERDA SANTOS

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES
DENTÁRIOS EM RATOS DIABÉTICOS: AVALIAÇÃO EM MICROTOMOGRFIA
COMPUTADORIZADA**

CAMPINA GRANDE

2020

JHONATAN THIAGO LACERDA SANTOS

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES
DENTÁRIOS EM RATOS DIABÉTICOS: AVALIAÇÃO EM MICROTOMOGRÁFIA
COMPUTADORIZADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão.

CAMPINA GRANDE

2020

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S237e Santos, Jhonatan Thiago Lacerda.
Efeitos da fotobiomodulação na osseointegração de implantes dentários em ratos diabéticos [manuscrito] : avaliação em microtomografia computadorizada / Jhonatan Thiago Lacerda Santos. - 2020.
72 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2022.

"Orientação : Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão, Departamento de Odontologia - CCBS."

1. Diabetes Mellitus. 2. Osseointegração. 3. Implantes dentários. 4. Terapia com luz de baixa intensidade. I. Título

21. ed. CDD 617.605

JHONATAN THIAGO LACERDA SANTOS

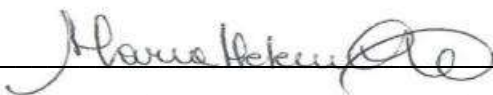
EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES
DENTÁRIOS EM RATOS DIABÉTICOS: AVALIAÇÃO EM MICROTOMOGRAFIA
COMPUTADORIZADA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Aprovada em 13/07/2020

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão (Orientadora)

Universidade Estadual da Paraíba



Prof. Dr. Eduardo Dias Ribeiro (1º Examinador)

Universidade Federal da Paraíba



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka (2º Examinador)

Universidade Estadual da Paraíba

*Dedico este trabalho à Deus, por todas as
bênçãos concedidas.*

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais,

*À minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão**, por confiar e me acolher em sua equipe. Agradeço pelas contribuições durante essa importante fase da minha formação, pela humildade e respeito demonstrados. Obrigado pelos desafios e oportunidades que me fizeram crescer como pessoa e como profissional. Deus abençoe a senhora e sua família com muita felicidade e saúde.*

*Ao **Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, pela constante disponibilidade, solicitude e pelas contribuições valiosas. Obrigado pelos conselhos e incentivo prestados durante tantos momentos. Deixo aqui registrado minha gratidão!*

*À **FIP Campina Grande**, por meio da **Profa. Dra. Paula Vanessa da Silva** e da **Profa. Me. Priscila Medeiros Bezerra**, por abrir as portas da instituição e autorizar o desenvolvimento desta pesquisa. Meu eterno agradecimento.*

Agradeço,

*À **Deus**, pelo dom da vida!*

*À minha **mãe**, pelo esforço e sacrifício durante este período para a realização deste objetivo. Obrigado por apoiar meu sonho! Muita gratidão também, a minha família que torceu por mim e vibrou com minhas vitórias.*

*À **Gélica Lima Granja**, presente em várias etapas da minha singela vida, deixo registrado a ti meu mais puro e sincero dos sentimentos. Agradeço pelo verdadeiro sentido da amizade, companheirismo e apoio durante essa caminhada.*

*Aos professores **Dr. Eduardo Dias Ribeiro** e **Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka** por aceitarem participar da minha banca examinadora, desde a qualificação do projeto até a defesa. Cada sugestão foi fundamental para o enriquecimento deste trabalho. Muito obrigado!*

*Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (PPgO-UEPB)** coordenado pelos professores **Dra. Daniela Pita de Melo** e **Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**. Parabéns pelo compromisso e dedicação!*

*Aos **professores e colaboradores do PPgO-UEPB** por todos os ensinamentos que contribuíram para minha formação acadêmica e profissional. Em especial à **Profa. Dra. Ana Flávia Granville-Garcia** pela preocupação, cuidado e carinho.*

*Aos **membros do grupo de pesquisa e da Liga Interdisciplinar de Laserterapia em Odontologia (LIL)** pela convivência durante esse período. Em especial, à **Ana Luzia Batista** pela ajuda, companheirismo e esforço compartilhado nessa jornada. Agradeço pela disponibilidade e conselhos que contribuíram para esse trabalho.*

*Ao **Prof. Dr. Jalber Almeida dos Santos** pelos conselhos, incentivo e confiança em mim depositados desde o início da minha trajetória acadêmica. Agradeço por me acolher nesta cidade, que Deus abençoe você e sua família.*

*À **Suelen Duarte e família**, pela ajuda durante a seleção do mestrado e por me receber de braços abertos em Campina Grande. Muito obrigado pelo suporte e por compartilharmos b momentos.*

*À equipe do Biotério da FIP Campina Grande, **Roberta Micheline, Alexandre Sales, Elizabete Sales e Daniela Chagas**. Aos colaboradores da FIP Campina Grande, em especial, **Joselino Dantas, Sara Pinheiro e Damião** pela ajuda na fase experimental desta pesquisa. Muito obrigado!*

*Aos colegas de turma **Allany Andrade, Ana Karina, Carlus Oliveira, Diego Silva, Gélica Granja, Natália Bezerra, Tiago Leal, Walter de Moraes e Wlliana Lima** pelos momentos compartilhados durante essa trajetória.*

*À empresa **Titaniumfix**, pela concessão dos implantes que viabilizou a execução deste trabalho. Obrigado pela confiança!*

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo auxílio financeiro concedido.*

Não menos importante, deixo uma palavra de gratidão a todas as pessoas que de alguma forma tocaram meu coração, trouxeram boas energias e me transmitiram força.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da fotobiomodulação com a luz Laser de baixa intensidade no processo da osseointegração de implantes dentários em ratos diabéticos por meio da microtomografia computadorizada (micro-CT). Foi realizado um estudo experimental *in vivo*, utilizando 24 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, linhagem *Wistar*, com idade entre 60 e 90 dias e massa entre 270-300 gramas. A diabetes foi induzida quimicamente através da injeção intraperitoneal de uma única dose de 40mg/kg de estreptozotocina. No quinto dia após a indução, somente os animais que apresentaram glicemia em jejum acima de 300mg/dl foram incluídos no estudo. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Grupo vermelho ($\lambda=660\text{nm}$, 100mW, 2J, 20 segundos); Grupo infravermelho ($\lambda=808\text{nm}$, 100 mW, 2J, 20 segundos); Grupo combinado ($\lambda=660\text{nm} + \lambda= 808\text{nm}$, 100 mW, 4J, 20 segundos); grupo controle (terapia simulada). Após a indução anestésica foi realizada a incisão, divulsão, acesso ao leito ósseo e perfuração com fresagem sob irrigação com soro fisiológico. A primeira aplicação da luz Laser foi realizada imediatamente após a fresagem óssea, em um ponto central no leito receptor do implante. Em seguida os implantes foram instalados na metáfise tibial direita. Após a sutura dos tecidos foi realizada a segunda aplicação de luz laser, em cinco pontos: um no centro da incisão, outro em 1cm à direita deste ponto central, outro 1cm à esquerda do ponto central, um ponto na face externa e outro na face interna da tíbia. O protocolo da fotobiomodulação foi repetido a cada 48 horas, durante um período de 28 dias, totalizando 14 sessões. Após o período experimental de 28 dias, os animais foram eutanasiados e as tíbias foram encaminhadas para análise da microarquitetura óssea trabecular em micro-CT, por meio dos parâmetros: Percentual de volume ósseo (BV/TV); Superfície óssea (BS); Número trabecular (Tb.N); Espessura trabecular (Tb.Th), Separação trabecular (Tb.Sp) e Densidade de conectividade (Conn.D). Os testes paramétricos, análise da variância (ANOVA *one-way*) e post-hoc de Tukey foram utilizados para a avaliação da morfologia e densidade óssea ($\alpha = 5\%$). Observou-se que o Percentual de volume ósseo ($p= 0,002$) e a média do Número de trabéculas ósseas ($p = 0,008$) foram maiores no grupo combinado em comparação aos grupos infravermelho, vermelho e controle. Os parâmetros Superfície óssea, Espessura trabecular, Separação trabecular e Densidade de conectividade não demonstraram diferença significativa entre os grupos propostos ($p>0,05$). Através deste estudo, foi possível concluir que a fotobiomodulação com a luz laser de baixa intensidade com emissão simultânea de dois comprimentos de onda (660nm e 808nm), favoreceu a osseointegração de implantes dentários em ratos diabéticos.

Palavras-chave: diabetes mellitus; osseointegração; implantes dentários; terapia com luz de baixa intensidade.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of photobiomodulation with low-level laser light on the process of osseointegration of dental implants in diabetic rats using micro computed tomography (micro-CT). An in vivo experimental study was carried out, using 24 male rats of the species *Rattus norvegicus*, class Mammalia, order Rodentia, strain Wistar, aged between 60 and 90 days and mass between 270-300 grams. Type II diabetes was chemically induced by intraperitoneal injection of a single dose of 40mg / kg of streptozotocin. On the fifth day after induction, only animals that had fasting blood glucose above 300mg / dl were included in the study. The animals were randomly divided into four experimental groups: Red group ($\lambda = 660\text{nm}$, 100mW, 2J, 20 seconds); Infrared group ($\lambda = 808\text{nm}$, 100 mW, 2J, 20 seconds); Combined group ($\lambda = 660\text{nm} + \lambda = 808\text{nm}$, 100 mW, 4J, 20 seconds); control group (simulated therapy). After anesthetic induction, incision, dissection, access to the bone bed and drilling with milling were performed under irrigation with saline. The first application of laser light was performed immediately after bone milling, at a central point in the implant receiving bed. Then the implants were installed in the right tibial metaphysis. After suturing the tissues, the second application of laser light was performed, in five points: one in the center of the incision, another in 1 cm to the right of this central point, another 1 cm to the left of the central point, one point on the external surface and another on internal tibia. The photobiomodulation protocol was repeated every 48 hours, for a period of 28 days, totaling 14 sessions. After the 28-day experimental period, the animals were euthanized and the tibiae were sent for analysis of the trabecular bone microarchitecture by micro-CT, using the parameters: Percentage of bone volume (BV/TV); Bone surface (BS); Trabecular number (Tb.N); Trabecular thickness (Tb.Th), Trabecular separation (Tb.Sp) and Connectivity density (Conn.D). Parametric tests, analysis of variance (ANOVA one-way) and post-hoc Tukey tests were used to assess bone morphology and density ($\alpha = 5\%$). It was observed that the Percentage of bone volume ($p = 0.002$) and the average Number of bone trabeculae ($p = 0.008$) were higher in the combined group compared to the infrared, red and control groups. The parameters Bone surface, Trabecular thickness, Trabecular separation and Density of connectivity did not show any significant difference between the proposed groups ($p > 0.05$). Through this study, it was possible to conclude that photobiomodulation with low intensity laser light with simultaneous emission of two wavelengths (660nm and 808nm), favored the osseointegration of dental implants in diabetic rats.

Keywords: diabetes mellitus; osseointegration; dental implants; low intensity light therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
FIGURA 1 - Fluxograma do estudo.....	19
FIGURA 2 - A: Tricotomia da região tibial; B: Incisão do plano dérmico; C: Exposição do leito ósseo para instalação do implante.....	22
FIGURA 3 - A: Leito receptor após fresagem óssea; B: Instalação do implante com chave hexagonal bidigital; C: Acomodação final do implante.....	23
FIGURA 4 - A: Sutura do plano muscular; B: Sutura do plano dérmico; C: Aplicação da luz laser imediatamente após o procedimento cirúrgico....	24
FIGURA 5 - A: Delimitação do corte axial; B: Seleção da região de interesse (ROI); C: Imagem binarizada para mensurações baseadas na escala de cinza (<i>threshold</i>).....	26
QUADRO 1 - Distribuição dos grupos de animais de acordo com as intervenções propostas.....	21
QUADRO 2 - Protocolo da fotobiomodulação por ponto de aplicação.....	24
QUADRO 3 - Parâmetros microtomográficos.....	26
QUADRO 4 - Variável independente do estudo.....	27
QUADRO 5 - Variáveis dependente do estudo.....	27

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Comparação da morfometria e densidade óssea entre os grupos propostos.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs	Produtos finais da glicação avançada
BS	Superfície óssea
BV	Volume ósseo
BV/TV	Proporção de volume ósseo
CESED	Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cm	Centímetro (unidade de comprimento).
cm²	Centímetro quadrado.
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Conn.D	Densidade de conectividade
FIP-CG	FIP Campina Grande
IL-6	Interleucina-6
J	Joule (unidade de energia)
Kg	Quilograma (unidade básica de massa)
LAMIB-UFPB	Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica da Universidade Federal da Paraíba
LASER	Do inglês <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> , traduzido como Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação
Mg	Miligrama (unidade de massa)
Micro-CT	Microtomografia computadorizada
Mw	Miliwatt (unidade de potência)
Nm	Nanômetro (unidade de comprimento)

n°	Número
°C	Grau Celsius (unidade de temperatura)
PB	Paraíba (estado brasileiro)
PINP	Propeptídeo aminoterminal do pró-colágeno tipo I
Tb.N	Número Trabecular
Tb.Sp	Separação Trabecular
Tb.Th	Espessura Trabecular
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
TV	Volume total
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

	Página
1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS..... 15
2	OBJETIVOS..... 18
2.1	OBJETIVO GERAL..... 18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 18
3	MATERIAIS E MÉTODOS..... 19
3.1	DESENHO DO ESTUDO..... 19
3.2	ASPECTOS ÉTICOS..... 20
3.3	LOCAL DA PESQUISA..... 20
3.4	AMOSTRA..... 20
3.5	INDUÇÃO DA DIABETES MELLITUS..... 20
3.6	GRUPOS EXPERIMENTAIS..... 21
3.7	ANESTESIA E TRICOTOMIA..... 21
3.8	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS..... 22
3.9	PARÂMETROS E PROTOCOLO DA APLICAÇÃO DO LASER..... 23
3.10	EUTANÁSIA..... 25
3.11	PROCESSAMENTO E ANÁLISE LABORATORIAL..... 25
3.11.1	Microtomografia Computadorizada (micro-CT)..... 25
3.12	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS..... 27
3.13	ELENCO DE VARIÁVEIS..... 27
4	ARTIGO..... 28
4.1	APRESENTAÇÃO..... 28
4.2	ARTIGO A SER SUBMETIDO..... 28
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 45
	REFERÊNCIAS..... 46
	APÊNDICES..... 50
	ANEXOS..... 55

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A implantodontia revolucionou a reabilitação de pacientes com ausência de elementos dentários, tornando-se uma modalidade de tratamento amplamente utilizada na prática diária do cirurgião dentista. Portanto, uma excelente opção para substituir próteses dentárias e dentes perdidos por implantes, proporcionando assim uma maior qualidade de vida aos pacientes reabilitados (SMEETS et al., 2016; SÁNCHEZ-SILES, 2017; NAGAHISA; ARAI; BABA, 2018).

Os implantes dentários oferecem funcionalidade mecânica e biológica com significativas vantagens quando comparados a próteses fixas ou removíveis (BUSER SENNERBY; DE BRUYN, 2017; SÁNCHEZ-SILES, 2017). Estudos demonstram alto índice de sucesso na reabilitação com implantes em pacientes saudáveis, apresentando taxas de sobrevivência acima de 94% (DEGIDI; NARDI; PIATTELLI, 2012; FISCHER; STENBERG, 2012; GOTFREDSEN, 2012; CAKARER et al., 2014; BUSER SENNERBY; DE BRUYN, 2017). A durabilidade, a previsibilidade e o sucesso nas reabilitações orais com implantes, estão intrinsecamente ligados aos fatores biológicos e biomecânicos da osseointegração (RAIKAR et al., 2017, AGHALOO et al., 2019).

A osseointegração foi descrita pela primeira vez por Brånemark na década de 1960 (BRÅNEMARK et al., 1969; BRÅNEMARK et al., 1983) e caracterizada como uma conexão estrutural e funcional entre o osso neoformado e a superfície do implante (ALBREKTSSON; JACOBSSON, 1987). Corresponde a um mecanismo fisiológico semelhante à consolidação de fratura, no qual a fresagem óssea para o implante equivale ao sítio ósseo traumatizado, culminando nas fases da cicatrização tecidual (VON WILMOWSKY et al., 2014).

O fenômeno da osseointegração é complexo e influenciado por fatores locais e sistêmicos. Quanto aos fatores sistêmicos, pesquisas indicam que pacientes com diabetes não controlado apresentam falha no processo de osseointegração (LUO et al., 2015; ANNIBALI et al., 2016).

A diabetes faz parte de um grupo de doenças não transmissíveis, caracterizada por uma alteração metabólica crônica, que ocorre quando a concentração de glicose no sangue está em excesso (KATYAYAN; KATYAYAN; SHAH, 2013). Isso acontece devido a deficiência na produção de insulina (diabetes tipo 1), ou devido a combinação entre resistência à ação da insulina e uma falha na secreção de insulina (diabetes tipo 2) (AMERICAN DIABETES

ASSOCIATION, 2013). São considerados critérios de diagnóstico da diabetes: hemoglobina glicada $\geq 6.5\%$; glicose plasmática aleatória ≥ 200 mg/dl; glicose plasmática em jejum ≥ 126 mg/dl (KERNER; BRÜCKEL, 2014). A prevalência global da diabetes corresponde a 9,34%, sendo considerada uma das principais prioridades de saúde pública (BERTOLDI et al., 2013).

A hiperglicemia induzida pela diabetes inibe a diferenciação osteoblástica, a mineralização e a adesão da matriz extracelular, além de estimular a reabsorção óssea, conseqüentemente, dificultando a osseointegração (OH et al., 2019). Portanto, adotar de terapias complementares que potencializam o processo da união estável e funcional entre o osso e a superfície dos implantes dentários, pode ser um recurso promissor para aumentar as taxas de sucesso na osseointegração.

Nas últimas décadas, observa-se um crescente interesse em investigar os efeitos da fotobiomodulação e suas aplicações clínicas em diferentes especialidades médicas e odontológicas (ASUTAY et al., 2018). A fotobiomodulação exerce um efeito estimulador nos tecidos, potencializando o processo de cicatrização (PRADOS-FRUTOS et al., 2016) e a resposta imunológica, além de reduzir o edema, a inflamação e a dor (LÓPEZ-RAMÍREZ et al., 2012; FERRANTE et al., 2013; ASUTAY et al., 2018).

Diante dos benefícios proporcionados pela fotobiomodulação, o *Ligth Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (LASER) tem sido adotado em diferentes tratamentos, como mucosite oral (DE CASTRO et al., 2013), sensibilidade dentária (MOOSAVI et al., 2015), osteonecrose (ESHGHPOUR et al., 2015), dor pós tratamento ortodôntico (REN; MCGRATH; YANG, 2015), assim como em cirurgias maxilofaciais e na implantodontia (FARHADI et al., 2017; ASUTAY et al., 2018; KOPARAL et al., 2018; TENIS et al., 2018).

As pesquisas em implantodontia buscaram investigar o potencial da fotobiomodulação na redução do tempo de cicatrização e melhora da regeneração óssea após a colocação do implante (ZAYED; HAKIM, 2020). Vários estudos investigaram os efeitos da fotobiomodulação na osseointegração (SALINA et al., 2006; BOLDRINI et al., 2013; GOMES et al., 2015; MASSOTTI et al., 2015; BLAY et al., 2016; KIM et al., 2016; MAYER et al., 2016; ZEIN; SELTING; BENEDICENTI, 2017), inclusive em pacientes diabéticos controlados (ELSYAD et al., 2019). A fotobiomodulação contribui para a estabilidade do implante, pois, potencializa a proliferação celular, a deposição de matriz óssea e a incorporação de cálcio e fósforo na superfície do implante, que conseqüentemente aumentam a densidade óssea (KHADRA et al., 2004; PINHEIRO; GERBI, 2006).

Em relação ao método de avaliação, o uso da microtomografia computadorizada (micro-CT) em Odontologia se destina ao estudo da microarquitetura óssea a partir da análise de procedimentos de reparo e regeneração; de novas terapias e intervenções cirúrgicas; da eficácia e uso de biomateriais; assim como a influência de doenças que afetam o metabolismo ósseo (IRIE, et al., 2018). Este método é considerado o padrão-ouro para avaliação do processo de osseointegração de implantes dentários em modelo animal, visto que apresenta vantagens em relação à análise histomorfométrica, pois, possibilita a análise em três dimensões (3D), avaliando o processo de reparo ósseo e a microestrutura do osso neoformado (BOUXSEIN et al., 2010; IRIE, et al., 2018).

Diante do exposto, este estudo teve por objetivo investigar os efeitos da fotobiomodulação com luz Laser de baixa intensidade no processo da osseointegração de implantes dentários em ratos diabéticos, por meio de parâmetros microtomográficos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da fotobiomodulação com luz laser no processo da osseointegração de implantes dentários em ratos diabéticos, por meio de parâmetros microtomográficos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

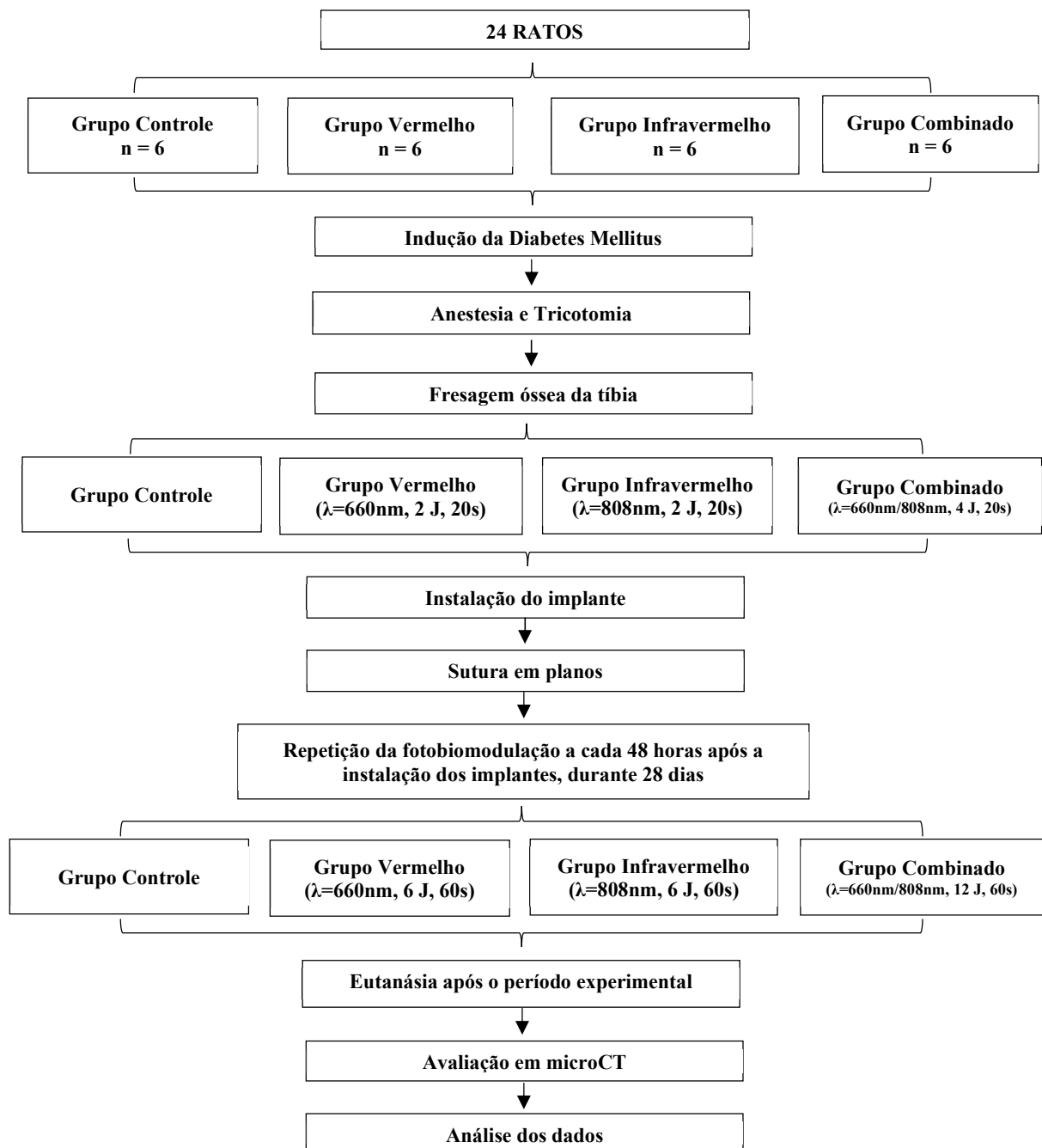
- Comparar o percentual de volume ósseo entre os grupos experimentais;
- Avaliar a área de osso na superfície do implante entre os grupos;
- Analisar o número de trabéculas ósseas entre os grupos;
- Verificar a espessura trabecular entre os grupos;
- Medir e comparar a separação trabecular entre os grupos;
- Avaliar o grau de conectividade das trabéculas ósseas entre os grupos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo experimental *in vivo*, para avaliar o efeito da fotobiomodulação com luz laser na osseointegração de implantes dentários em ratos diabéticos (FIGURA 1).

Figura 1 – Fluxograma do estudo



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) localizada em Patos, Paraíba, Brasil e aprovado sob o n° de protocolo 116/2019 (ANEXO A). Todo o experimento seguiu os preceitos da Lei n° 11.794 de 88 de outubro de 2008, no decreto n° 6.899 de 15 de julho de 2009 e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os pesquisadores envolvidos declararam ciência das obrigações cabidas (APÊNDICES C e D).

3.3 LOCAL DA PESQUISA

A fase experimental foi conduzida no Biotério da FIP Campina Grande (FIP-CG), localizado em Campina Grande, Paraíba, Brasil. A etapa de aquisição e avaliação por microtomografia computadorizada (micro-CT), foi desenvolvida no Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica da Universidade Federal da Paraíba (LAMIB-UFPB), localizado em João Pessoa, Paraíba, Brasil.

3.4 AMOSTRA

Foram utilizados 24 ratos machos, da espécie *Rattus norvegicus*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, linhagem *Wistar*, com idade entre 60 e 90 dias, massa entre 270 e 300 gramas, provenientes do biotério da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em Recife, Pernambuco, Brasil.

Durante todo o período experimental os animais foram mantidos no Biotério da FIP-CG, em caixas de polipropileno, forradas com maravalha, fechadas com tampa metálica por onde receberam água *ad libitum* por sucção em frasco de vidro e ração padronizada (*Presence*[®] Ratos e Camundongos, Linha Laboratório, Paulínia, São Paulo, Brasil). Foram mantidos o máximo de cinco animais por caixa. A temperatura do biotério foi mantida entre 22°C e 24°C, sob iluminação controlada (12 horas de ciclo claro e 12 horas de ciclo escuro).

3.5 INDUÇÃO DA DIABETES MELLITUS

Inicialmente foi verificado o nível glicêmico dos animais, por meio do glicosímetro Accu-Chek Active Meter (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, USA) para descartar a

possibilidade de diabetes pré-existente. Os animais foram submetidos a um jejum prévio de 12 horas para dieta sólida e em seguida, foram pesados. A diabetes foi induzida quimicamente através da aplicação intraperitoneal, com seringa e agulha estéreis de 1 mL para insulina (SR[®], Manaus, Amazonas, Brasil), de uma única dose de 40 mg/kg de estreptozotocina (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) dissolvida em solução tampão (citrato de sódio pH 4.5) na proporção de 1 mL/kg. Após duas horas, os animais receberam alimento sólido e foram mantidos no biotério com acompanhamento diário para análise da evolução do quadro clínico. No 5º dia, somente os animais que apresentaram alterações clínicas e laboratoriais compatíveis com a diabetes foram incluídos no estudo. As alterações clínicas observadas foram perda de peso, aumento da ingestão hídrica e do débito urinário. As alterações laboratoriais foram representadas por glicemia em jejum acima de 300 mg/dL. Todas as informações pertinentes a esse processo, como data da indução, dose da estreptozotocina, peso dos animais e os parâmetros para confirmação da diabetes, foram registradas em uma ficha específica (APÊNDICE A).

3.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, com seis animais cada, sob um período experimental de 28 dias. Para os grupos experimentais foi aplicada uma das intervenções propostas neste estudo (QUADRO 1).

Quadro 1 - Distribuição dos grupos de animais de acordo com as intervenções propostas.

GRUPOS	N	INTERVENÇÃO	TEMPO (DIAS)
GRUPO VERMELHO	6	LASER vermelho	28
GRUPO INFRAVERMELHO	6	LASER infravermelho	28
GRUPO COMBINADO	6	LASER vermelho e infravermelho	28
GRUPO CONTROLE	6	Terapia Simulada	28

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

3.7 ANESTESIA E TRICOTOMIA

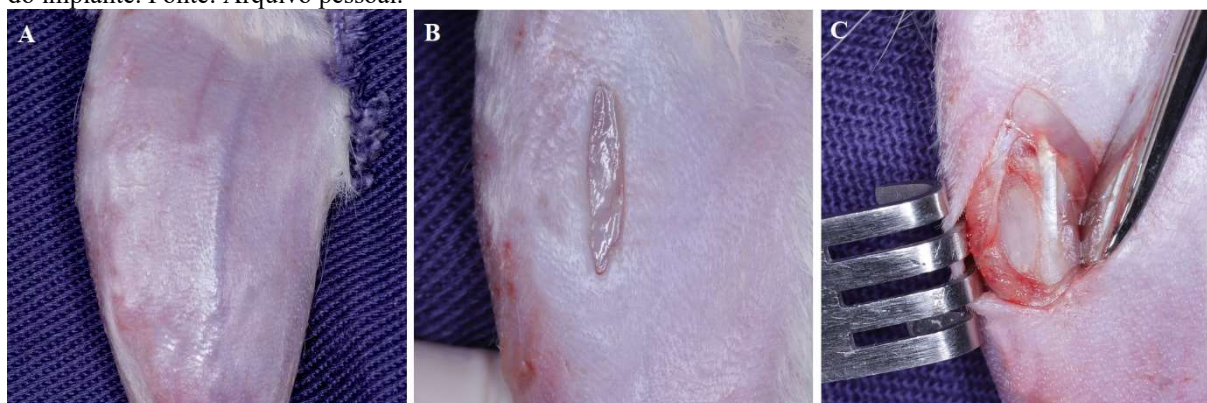
A anestesia dos animais foi realizada por meio da associação anestésica de 100mg/kg de Ketamina 10% (Dopalen[®] Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP, Brazil) e 10 mg/kg

Xilazina 2% (Anasedan[®] Vet Brands International, Miramar, FL, USA) aplicada na região intraperitoneal com uma seringa e agulha estéreis de 1mL para insulina (SR[®], Manaus, Amazonas, Brasil). Após constatação do plano anestésico profundo, os ratos foram posicionados em decúbito ventral e foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia (FIGURA 2A), utilizando porta-agulha e lâmina de barbear (LORD[®] Co., Alexandria, Egito).

3.8 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um único operador, previamente treinado. Após a tricotomia da região, foi realizada a antissepsia com gaze estéril embebida em digliconato de clorexidina 2% (Riohex[®] 2%, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) e aposição do campo estéril fenestrado. Para obter hemostasia e analgesia pós-operatória, foi realizada anestesia local com mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (DFL, Rio de Janeiro, Brasil). Realizou-se uma incisão dos planos dérmico (FIGURA 2B) e muscular utilizando lâmina de bisturi número 15C (Solidor[®], Joinville, Santa Catarina, Brasil), seguida de dissecação da musculatura para permitir acesso à metáfise tibial direita (FIGURA 2C), preservando as estruturas nobres adjacentes.

Figura 2 – A: Tricotomia da região tibial; B: Incisão do plano dérmico; C: Exposição do leito ósseo para instalação do implante. Fonte: Arquivo pessoal.

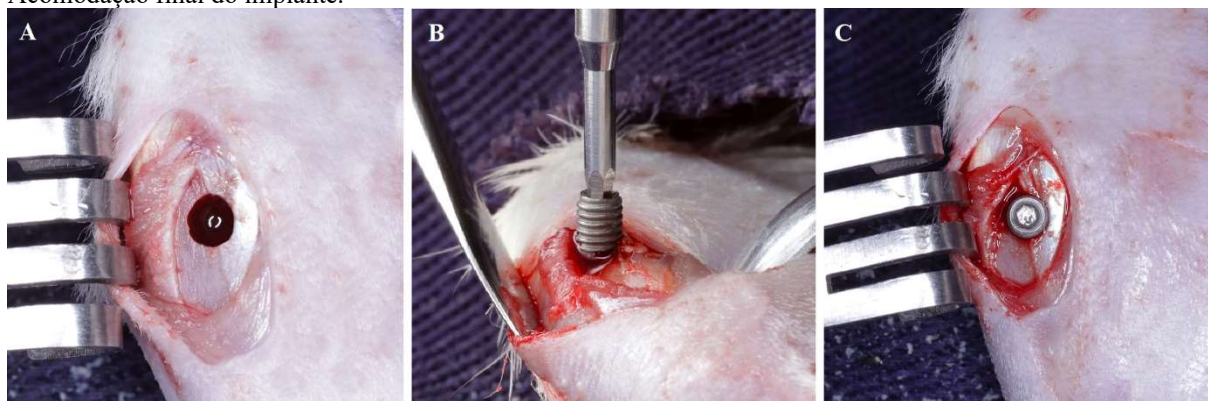


Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Para a instalação do implante foi utilizada a técnica de escalonamento, no qual a primeira perfuração foi realizada com fresa lança 2.0mm de diâmetro, seguido de fresa helicoidal 2.0mm de diâmetro, montadas em motor elétrico (NSK SURGIC PRO[®]; Joinville, Santa Catarina, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução salina estéril a 0,9% (Fisiológico[®], Laboratórios Biosintética Ltda[®], Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), contra ângulo com redução 20:1 (Ti-Max X, NSK Nakanishi Inc.; Shimohinata, Tochigi-ken,

Japão). Após a fresagem, (FIGURA 3A) foi aplicada a luz Laser em um ponto central da fresagem de acordo com o protocolo experimental de cada grupo. Um implante cilíndrico de titânio com tratamento de superfície *Sandblasted, Large-grit, and Acid-etched* (SLA) (AS Technology, Titanium Fix Dental Implants, São José dos Campos, SP, Brasil), diâmetro de 2.0 mm e altura de 4.0 mm, esterilizado por raios gama, foi instalado utilizando chave hexagonal bidigital, com travamento e estabilidade inicial (FIGURAS 3B e 3C).

Figura 3 – A: Leito receptor após fresagem óssea; B: Instalação do implante com chave hexagonal bidigital; C: Acomodação final do implante.



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Em seguida os tecidos foram suturados em planos (FIGURAS 4A e 4B), utilizando fio monofilamentar (Nylon 4-0, Procure®, Medico Industries & Traid Co., Shijiazhuang, China). No pós-operatório imediato foi administrada uma dose única intramuscular de 0,2 mL de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP) e 0,2 mL de dipirona sódica 500mg (D-500, Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil) por via subcutânea. Para reduzir a dor pós-operatória a medicação analgésica foi administrada a cada seis horas, durante 3 dias.

3.9 PARÂMETROS E PROTOCOLO DA APLICAÇÃO DO LASER

Para a fotobiomodulação foram utilizados o Laser de diodo vermelho $\lambda=660\text{nm}$ (*Therapy EC*, DMC Equipamentos, São Carlos, São Paulo, Brasil), infravermelho $\lambda=808\text{nm}$ (*Therapy EC*, DMC Equipamentos, São Carlos, São Paulo, Brasil) e a combinação de ambos os comprimentos de onda emitidos simultaneamente $\lambda=660\text{nm} + \lambda=808\text{nm}$ (*Therapy EC*, DMC Equipamentos, São Carlos, São Paulo, Brasil) (QUADRO 2).

Quadro 2 - Protocolo da fotobiomodulação por ponto de aplicação.

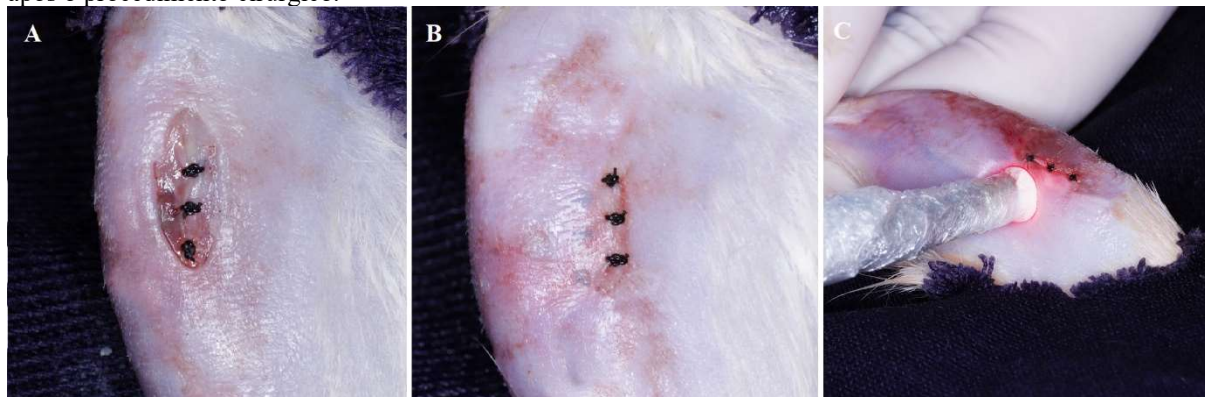
PARÂMETROS	VERMELHO	INFRAVERMELHO	VERMELHO + INFRAVERMELHO
Potência	100 mW	100 mW	100 mW
Comprimento de onda	660±10nm	808±10nm	660±10nm e 808±10nm
Energia por ponto	2J	2J	4J
Tempo de exposição	20s	20s	20s
Diâmetro do feixe	0.028mm	0.028mm	0.028mm
Modo de emissão	Contínuo	Contínuo	Contínuo

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

A aplicação da luz Laser foi realizada por um único pesquisador devidamente treinado, seguindo todas as normas de biossegurança, incluindo o uso de óculos de proteção para o operador. Além disso, foi utilizado um filme plástico na ponteira do equipamento para evitar possíveis contaminações no leito cirúrgico.

A primeira aplicação foi realizada imediatamente após a fresagem da tíbia, em um ponto central no leito receptor do implante. A segunda aplicação sucedeu a instalação dos implantes e sutura dos tecidos, em cinco pontos: um no centro da incisão, outro em 1cm à direita deste ponto central, outro 1cm à esquerda do ponto central, um ponto na face externa e outro na face interna da tíbia (FIGURA 4C). As aplicações foram repetidas a cada 48h, durante um período de 28 dias, totalizando 14 sessões. Os animais do grupo controle receberam a irradiação simulada seguindo o mesmo protocolo, porém sem emitir energia.

Figura 4 – A: Sutura do plano muscular; B: Sutura do plano dérmico; C: Aplicação da luz laser imediatamente após o procedimento cirúrgico.



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

3.10 EUTANÁSIA

Após o período experimental de 28 dias, os animais foram eutanasiados, por meio de overdose anestésica, com associação de Ketamina 10% (Dopalen[®] Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP, Brazil) e Xilazina 2% (Anasedan[®] Vet Brands International, Miramar, FL, USA) aplicada na região intraperitoneal com seringa e agulha estéreis de 1 mL para insulina (SR[®], Manaus, Amazonas, Brasil). A morte foi constatada por dois avaliadores treinados, por meio da ausência de reflexo corneal e batimentos cardíacos dos animais.

3.11 PROCESSAMENTO E ANÁLISE LABORATORIAL

Para remoção das peças submetidas a análises, foi realizada osteotomia com margem de ± 3 cm na tíbia correspondente ao implante instalado, com broca carbide cônica diamantada Nº 701 (Angelus Prima Dental Ltda., Londrina, PR, Brasil) montada em peça de mão reta conectada ao motor cirurgico (NSK SURGIC PRO[®]; Joinville, Santa Catarina, Brasil), sob irrigação com solução salina estéril a 0,9% (Fisiológico[®], Laboratórios Biosintética Ltda[®], Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). As peças foram envolvidas em compressa de gaze e mantidas submersas em recipiente devidamente vedado, contendo solução de formol a 10%, identificados com o código correspondente ao animal.

3.11.1 Microtomografia Computadorizada (micro-CT)

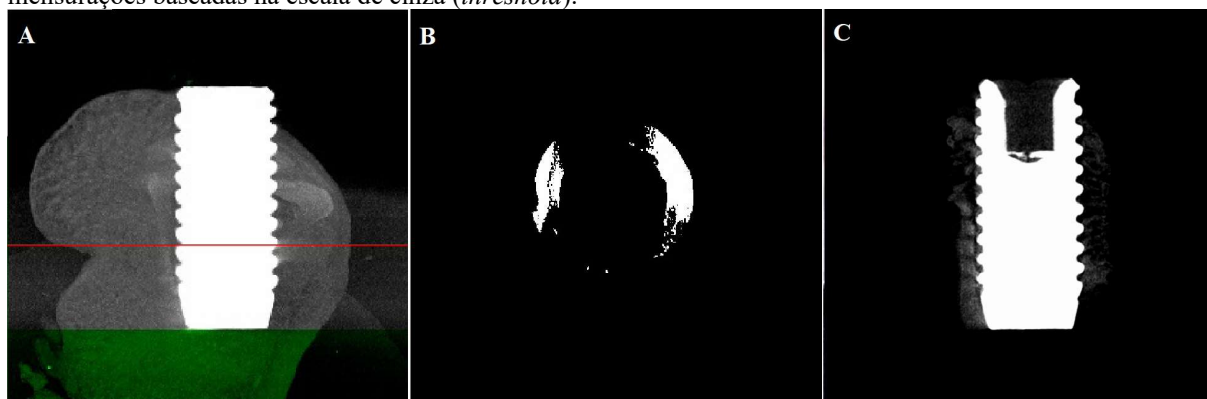
As peças foram encaminhadas para o escaneamento por micro-CT no LAMIB-UFPB, no qual foram submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan[®] 1172 (Bruker MicroCT, Kontich, Belgium) em alta resolução, operando a uma voltagem de 100 kV, amperagem de 100 μ A, potência de 10 W em uma rotação de 360° ao redor do eixo vertical e um passo de rotação de 0,4°, com filtro de alumínio e cobre de 1,0 mm e uma resolução de imagem de 6,9 μ m. As imagens foram reconstruídas com um software específico nas três dimensões espaciais e em seguida todas as imagens foram orientadas e salvas em cortes sagitais (2000 x 1336) com software Skyscan.

As imagens obtidas foram reconstruídas usando um *software* de reconstrução tomográfica (NRecon v.1.6.9.4, Bruker, Kontich, Bélgica) com 2% de suavização, 4% de

correção de artefato de anel e 10% de correção de endurecimento de feixe, fornecendo cortes sagitais e axiais.

Em seguida, utilizando um corte axial no *software* CTAnalyser (CTAn v.1.12, Bruker, Kontich, Bélgica) (FIGURA 5A), foi definida uma região de interesse (ROI) delimitada por 0,5 mm em torno de todo o implante (FIGURA 5B). Esta área foi definida como Área Total (0,5mm de margem ao redor dos implantes). Por meio do software CTAn foram realizadas as análises e mensurações das imagens de acordo com a escalas de cinza (*threshold*) (FIGURA 5C). O *threshold* utilizado na análise foi de 25-180 tons de cinza, que possibilitou a obtenção das medidas descritas no Quadro 3. Os dados obtidos foram registrados em uma ficha específica (APÊNDICE B).

Figura 5 – A: Delimitação do corte axial; B: Seleção da região de interesse (ROI); C: Imagem binarizada para mensurações baseadas na escala de cinza (*threshold*).



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Quadro 3 - Parâmetros microtomográficos.

ABREVIACÃO	DESCRIÇÃO	UNIDADE PADRÃO
TV	Volume total	mm ³
BV	Volume ósseo	mm ³
BV/TV	Proporção de volume ósseo	%
BS	Superfície óssea	mm ²
Tb.N	Número Trabecular	1 / mm
Tb.Th	Espessura Trabecular	Mm
Tb.Sp	Separação Trabecular	Mm
Conn.D	Densidade de conectividade	1 / mm ³

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

3.12 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos foram organizados e analisados no *software IBM SPSS Statistics* (versão 25.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Realizou-se a análise de normalidade das variáveis dependentes, através do Teste Z ($p < 1,96$) (KIM, 2013). Os testes paramétricos, análise da variância (ANOVA one-way) e post-hoc de Tukey foram utilizados para a avaliação da morfologia e densidade óssea, com nível de significância estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

3.13 ELENCO DE VARIÁVEIS

As variáveis independente e dependentes deste estudo, estão descritas nos Quadro 4 e 5, respectivamente.

Quadro 4 - Variável independente.

VARIÁVEL	DESCRIÇÃO	NATUREZA	CATEGORIZAÇÃO
Grupo de Intervenção	Intervenções utilizadas no estudo.	Qualitativa nominal	0 - Laser vermelho 1 - Laser infravermelho 2 - Combinado 3 - Controle

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Quadro 5 - Variáveis dependentes.

VARIÁVEL	DESCRIÇÃO	NATUREZA
Percentual de volume ósseo (BV/TV)	Proporção do volume ósseo em relação ao volume total da região de interesse.	Quantitativa contínua
Superfície óssea (BS)	Área da superfície óssea.	Quantitativa contínua
Número trabecular (Tb.N)	Número médio de trabéculas por unidade de comprimento.	Quantitativa contínua
Espessura trabecular (Tb.Th)	Espessura média das trabéculas.	Quantitativa contínua
Separação trabecular (Tb.Sp)	Distância média entre as trabéculas.	Quantitativa contínua
Densidade de conectividade (Conn.D)	Grau de conectividade das trabéculas.	Quantitativa contínua

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

4 ARTIGO

4.1 APRESENTAÇÃO

O projeto de pesquisa ora desenvolvido foi apresentado e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Como resultado da execução desse projeto, um artigo é apresentado nesta dissertação: **“Efeito da fotobiomodulação com luz laser no processo de osseointegração em ratos diabéticos: uma avaliação por microtomografia computadorizada”**.

O referido artigo será submetido ao periódico *Dentomaxillofacial Radiology* (ISSN: 1476-542X, Fator de Impacto: 1.796, Qualis Odontologia A1), cujas normas para submissão de trabalhos estão apresentadas no Anexo B.

4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

Efeito da fotobiomodulação com luz laser no processo de osseointegração em ratos diabéticos: uma avaliação por microtomografia computadorizada

Título breve: **Efeito da fotobiomodulação na osseointegração em ratos diabéticos.**

Jhonatan Thiago Lacerda-Santos¹, Ana Luzia Araújo Batista¹, Eduardo Dias-Ribeiro², Cassiano Francisco Weege Nonaka¹, Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão¹

¹Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

Conflitos de Interesse

Todos os autores declaram que não há conflitos de interesses.

Autor Correspondente:

Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão

Universidade Estadual da Paraíba

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Rua Baraúna, 531, Bairro Universitário, Campina Grande, PB, Brasil

CEP 58429-500 Telefone/Fax: +55 83 3315-3471

e-mail: mhcvcatao@gmail.com

Resumo

Objetivos: avaliar os efeitos da fotobiomodulação com luz laser de baixa intensidade no processo de osseointegração de implantes dentários em ratos diabéticos por meio da microtomografia computadorizada. Métodos: Foi realizado um estudo experimental *in vivo*, com 24 ratos machos, alocados aleatoriamente em quatro grupos: vermelho ($\lambda=660\text{nm}$), infravermelho ($\lambda=808\text{nm}$), combinado ($\lambda=660\text{nm} + \lambda=808\text{nm}$) e controle (terapia simulada). Um implante foi instalado na tíbia de cada animal e a fotobiomodulação foi realizada conforme o grupo determinado, imediatamente após a fresagem óssea e repetida a cada 48 horas. Após o período experimental de 28 dias, os animais foram eutanasiados e as tíbias foram encaminhadas para análise da microarquitetura óssea trabecular por microtomografia computadorizada, por meio dos parâmetros: Percentual de volume ósseo (BV/TV); Superfície óssea (BS); Número trabecular (Tb.N); Espessura trabecular (Tb.Th), Separação trabecular (Tb.Sp) e Densidade de conectividade (Conn.D). Os testes análise da variância (ANOVA one-way) e post-hoc de Tukey

foram utilizados para a avaliação da morfologia e densidade óssea ($\alpha = 5\%$). Resultados: Observou-se que o percentual de volume ósseo ($p= 0,002$) e a média do número de trabéculas ósseas ($p = 0,008$) foram maior no grupo combinado em comparação aos grupos infravermelho, vermelho e controle. Os demais parâmetros avaliados não demonstraram diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$). Conclusões: A fotobiomodulação com a luz laser de baixa intensidade com emissão simultânea de dois comprimentos de onda (660nm e 808nm), favoreceu a osseointegração de implantes dentários em ratos diabéticos.

PALAVRAS-CHAVE: Implantes dentários; Osseointegração; Terapia com Luz de Baixa Intensidade; Diabetes mellitus; Microtomografia por Raio-X.

Introdução

Os implantes dentários são amplamente utilizados na Odontologia para substituir dentes ausentes¹. Quando comparados a próteses fixas ou removíveis, oferecem vantagens na funcionalidade mecânica e biológica², com uma taxa de sucesso acima de 95%¹. Esse resultado só foi possível devido à descoberta da osseointegração pelo professor Per-Ingvar Branemark³. A osseointegração corresponde a conexão estrutural direta e funcional entre o osso vivo e a superfície de um implante, resultando em formação óssea na interface osso/implante, sem a presença de processo inflamatório³⁻⁴.

Entretanto, o insucesso dos implantes dentários ocorre quando há falha na osseointegração, devido a diversos fatores locais e relacionados ao paciente⁵⁻⁶. Dentre os fatores relacionados ao paciente podem ser destacados idade, sexo, tabagismo, etilismo, má higiene bucal e presença de doença sistêmica⁵.

A diabetes é um distúrbio metabólico sistêmico, caracterizado por hiperglicemia⁶. Segundo a Federação Internacional de Diabetes, até 2019 essa doença atingiu

463 milhões de adultos entre 20 e 79 anos, e estima-se que nos próximos dez anos esse número alcance 578 milhões da população mundial nessa faixa etária⁷. Os principais responsáveis para o aumento da diabetes mellitus no mundo, são o envelhecimento da população, a ascendente prevalência de obesidade, o sedentarismo e a urbanização⁸.

A hiperglicemia aumenta a liberação local de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), que reduzem a ligação osteoblasto-osteoclasto, fundamental para a osseointegração⁹. Além disso, reduz a taxa de osteocalcina, fosfatase alcalina e propeptídeo aminoterminal do pró-colágeno tipo I (PINP), bem como aumenta a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs)¹⁰. Desta forma, a hiperglicemia provoca um desequilíbrio no mecanismo de formação óssea.

Assim, pacientes diabéticos estão mais suscetíveis a infecções localizadas e, portanto, apresentam retardo na osseointegração de implantes, necessitando de duas vezes mais tempo, quando comparado a pacientes saudáveis⁴. Desta forma, destaca-se a necessidade de investigar terapias complementares que potencializem o processo da osseointegração, e, dessa forma, aumentem as taxas de sucesso na reabilitação de indivíduos diabéticos com implantes dentários.

A fotobiomodulação de baixa intensidade com a luz Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) é um fenômeno que corresponde as alterações celulares a partir da interação com comprimentos de onda que podem variar desde a luz vermelha ao infravermelho¹¹. Essa interação resulta no aumento da produção de ATP, que estimula a proliferação e diferenciação celulares, contribuindo para a neoformação óssea e angiogênese¹²⁻¹⁴. Desse modo, a fotobiomodulação reduz o edema, a inflamação e da dor, fortalece a resposta imunológica¹⁶⁻¹⁸ e potencializa o processo de cicatrização¹⁵.

Várias terapias foram testadas para favorecer a osseointegração em ratos diabéticos, como o uso de tratamento de superfície dos implantes¹⁹⁻²⁰ e terapias locais ou sistêmicas²¹⁻²². Entretanto, estudos que investigaram o efeito da fotobiomodulação na osseointegração em

indivíduos diabéticos são escassos²³. Nesse contexto, este estudo teve por objetivo investigar os efeitos da fotobiomodulação de baixa intensidade com luz Laser no processo da osseointegração de implantes dentários em ratos diabéticos, por meio de parâmetros microtomográficos.

Materiais e Métodos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) (nº de protocolo 116/2019). O experimento foi composto por 24 ratos machos *Wistar*, com idade entre 60 e 90 dias, e massa entre 270 e 300 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas com temperatura controlada entre 22°C e 24°C, sob iluminação controlada com um ciclo claro-escuro de 12 horas cada, acesso a água *ad libitum* e ração (Presence® Ratos e Camundongos, Linha Laboratório, Paulínia, São Paulo, Brasil).

Indução da Diabetes Mellitus

Os animais foram submetidos a um jejum prévio de 12 horas para dieta sólida. Em seguida, a diabetes foi induzida quimicamente através da injeção intraperitoneal de uma dose única de 40mg/kg de estreptozotocina (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) dissolvida em solução tampão (0,01 M; citrato de sódio pH 4.5). No 5º dia, o nível glicêmico foi verificado por meio do glicosímetro Accu-Chek Active Meter (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, USA) coletado na cauda do animal. Somente os animais que apresentaram glicemia em jejum acima de 300mg/dL foram considerados diabéticos e incluídos no estudo.

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: grupo vermelho (VERM; n = 6), grupo infravermelho (INFRA; n = 6), grupo vermelho + infravermelho (COMBINADO; n = 6) e grupo controle (CTRL; n = 6).

Procedimentos Cirúrgicos

Instalação do Implante

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um único operador, previamente treinado. Foi realizada a anestesia dos animais por meio de injeção intraperitoneal de 100mg/kg de Ketamina 10% (Dopalen[®] Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP, Brazil) e 10 mg/kg Xilazina 2% (Anasedan[®] Vet Brands International, Miramar, FL, USA) e anestesia local com mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (DFL, Rio de Janeiro, Brasil).

Após a tricotomia foi realizada uma incisão utilizando lâmina de bisturi número 15C (Solidor[®], Joinville, Santa Catarina, Brasil), seguida de dissecação para permitir acesso à metáfise tibial direita, preservando as estruturas nobres adjacentes. Foi instalado um implante cilíndrico de titânio (2.0 mm de diâmetro e 4.0 mm de comprimento; AS Technology, Titanium Fix Dental Implants, São José dos Campos, SP, Brasil) utilizando chave hexagonal bidigital, com travamento e estabilidade inicial. Em seguida os tecidos foram suturados utilizando fio monofilamentar (Nylon 4-0, Procure[®], Medico Industries & Traid Co., Shijiazhuang, China).

Pós-operatório

No pós-operatório imediato foi administrada uma dose única intramuscular de 0,2 mL de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal

Ltda., Campinas, SP). Também foi administrado 0,2 mL de dipirona sódica 500mg (D-500, Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil) por via subcutânea, a cada seis horas, durante 3 dias.

Protocolo da Fotobiomodulação

A fotobiomodulação foi realizada com a luz Laser (aparelho Laser de diodo *Therapy EC*, DMC Equipamentos, São Carlos, São Paulo, Brasil), no modo contínuo e diâmetro do feixe de 0.028mm. Para o grupo VERM foi utilizado $\lambda=660\text{nm}$, potência 100mW, energia 2J, durante 20 segundos; grupo INFRA $\lambda=808\text{nm}$, 100mW, energia 2J, durante 20 segundos; e o grupo COMBINADO foram emitidos simultaneamente $\lambda=660\text{nm} + \lambda=808\text{nm}$, 100mW, energia 4J, durante 20 segundos.

A primeira aplicação foi realizada imediatamente após a fresagem da tíbia, em um ponto central do leito ósseo. A segunda aplicação sucedeu a sutura dos tecidos, em cinco pontos: um no centro da incisão, outro em 1 cm à direita deste ponto central, outro 1 cm à esquerda do ponto central, um ponto na face externa e outro na face interna da tíbia. As aplicações foram repetidas a cada 48h, durante um período de 28 dias, totalizando 14 sessões. Os animais do grupo controle receberam a irradiação simulada seguindo o mesmo protocolo, porém sem emitir energia. Todas as aplicações da fotobiomodulação foram realizadas por um único pesquisador devidamente treinado, seguindo todas as normas de biossegurança.

Eutanásia

Os níveis glicêmicos foram verificados no dia 28, após o período experimental. Em seguida os animais foram eutanasiados por meio de overdose anestésica, com associação de

Ketamina 10% (Dopalen[®] Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP, Brazil) e Xilazina 2% (Anasedan[®] Vet Brands International, Miramar, FL, USA) aplicada na região intraperitoneal.

Foi realizada dissecação e osteotomia com margem de ± 3 cm na tíbia correspondente ao implante instalado. As peças foram armazenadas em solução de formol a 10%, para avaliação por microtomografia computadorizada (micro-CT).

Análise por Microtomografia Computadorizada

As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan[®] 1172 (Bruker MicroCT, Kontich, Belgium) em alta resolução, operando a uma voltagem de 100 kV, amperagem de 100 μ A, potência de 10 W em uma rotação de 360° ao redor do eixo vertical e um passo de rotação de 0,4°, com filtro de alumínio e cobre de 1,0mm e uma resolução de imagem de 6,9 μ m. As imagens obtidas foram reconstruídas (NRecon v.1.6.9.4, Bruker, Kontich, Bélgica) com 2% de suavização, 4% de correção de artefato de anel e 10% de correção de endurecimento de feixe, fornecendo cortes sagitais e axiais.

Em seguida, utilizando um corte axial no *software* CTAnalyser (CTAn v.1.12, Bruker, Kontich, Bélgica), foi definida uma região de interesse (ROI) delimitada por 0,5 mm em torno de todo o implante. As análises foram realizadas de acordo com a escala de 25-180 tons de cinza (threshold). Foram avaliados os seguintes parâmetros: Volume total (TV) que corresponde ao volume total da região de interesse; Volume ósseo (BV), se refere a área de osso presente no ROI; Superfície óssea (BS), ou seja, a área de superfície óssea; (BV/TV) que representa o percentual de volume ósseo; Número Trabecular (Tb.N), sendo o número médio de trabéculas; Espessura trabecular (Tb.Th), isto é, a espessura média das trabéculas ósseas; Separação trabecular (Tb.Sp), se refere a distância média entre as trabéculas ósseas; e, Densidade de conectividade (Conn.D), ou seja, o grau de conectividade das trabéculas.

Análise dos Dados

Os dados foram analisados no software IBM SPSS Statistics (versão 25.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Realizou-se a análise da distribuição de normalidade das variáveis dependentes, através do Teste Z ($p < 1,96$)²⁴. Os testes de análise da variância (ANOVA one-way) e post-hoc de Tukey foram utilizados para a avaliação da morfologia e densidade óssea. Em todas as análises, o nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Observou-se que o percentual de volume ósseo (BV/TV) e o número de trabéculas (Tb.N) ósseas foram maiores no grupo COMBINADO em comparação aos grupos INFRA, VERM e CTRL ($p < 0,05$). Os parâmetros Superfície óssea (BS), Espessura trabecular (Tb.Th), Separação trabecular (Tb.Sp) e Densidade de conectividade (Conn.D) não demonstraram diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (Tabela 1).

No entanto, foi possível observar, sem significância estatística, que o grupo VERM apresentou os maiores valores de BS e Conn.D ($p > 0,05$). Enquanto que o grupo CTRL apresentou maior Tb.Th ($p > 0,05$) e o grupo COMBINADO exibiu menor Tb.Sp ($p > 0,05$).

Discussão

Este estudo revelou que a fotobiomodulação utilizando a emissão simultânea dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho contribuiu para o aumento do percentual de volume ósseo e da quantidade de trabéculas ósseas. Este é o primeiro estudo que avaliou os efeitos da fotobiomodulação de baixa intensidade na osseointegração de implantes a partir de um modelo experimental em ratos diabéticos. Sabendo-se que os efeitos da diabetes mellitus

no osso ao redor do implante diminuem ou retardam a cicatrização óssea²⁵⁻²⁸, investigações nesse contexto são importantes para identificar tratamentos que auxiliem a osseointegração de implantes dentários em pacientes diabéticos.

Neste estudo, a avaliação por micro-CT evidenciou que apenas a fotobiomodulação com irradiação simultânea dos comprimentos de onda 660nm e 808nm influenciou positivamente no percentual de volume ósseo e contribuiu para o aumento de trabéculas ósseas em ratos diabéticos. Estudos realizados em modelos experimentais também observaram que a fotobiomodulação de baixa intensidade apresentou efeitos relevantes na regeneração óssea²⁹⁻³¹.

O grande desafio da fotobiomodulação consiste em definir a dose efetiva³². A aplicação incorreta de parâmetros de energia, potência e tempo de exposição pode levar a um resultado ineficaz³³. Neste estudo observou-se que o protocolo com emissão simultânea dos comprimentos de onda 630nm e 808nm, modo contínuo, energia 4J, potência 100mW, durante 20 segundos por ponto, apresentou resultados favoráveis. Esses resultados podem ser explicados devido ao efeito biomodulador positivo no reparo ósseo, já demonstrado em estudos anteriores^{29-31, 34-38}. Entretanto, não há na literatura um protocolo padrão de irradiação com luz laser para melhorar a osseointegração de implantes dentários. Desse modo os resultados encontrados no presente estudo podem subsidiar novas pesquisas, a fim de estabelecer esses parâmetros.

Estudos prévios que avaliaram a atividade das células ósseas após irradiação com luz vermelha, verificaram que a fotobiomodulação aumentou a atividade celular, promoveu a diferenciação dos osteoblastos e estimulou a liberação de fatores de crescimento^{12,23,36,39}. Um estudo *in vivo*, que avaliou a eficácia da luz infravermelha (830 nm) no reparo ósseo em fêmures de ratos, evidenciou maior concentração de fibras colágenas na ferida, aumento da neoformação óssea apresentando trabéculas mais densas e mais organizadas³⁵. Um estudo clínico realizado com 20 pacientes diabéticos moderadamente controlados, observou que a irradiação com luz

infravermelha (940 nm, 15 J, 2 mW, 60 segundos por ponto) contribuiu para a estabilidade inicial dos implantes nos seis primeiros meses após a reabilitação com carga²³. Essa melhora na estabilidade inicial pode ser justificada devido ao efeito biomodulador do laser infravermelho durante a fase inicial de proliferação e diferenciação celulares²³. No entanto, na presente pesquisa, foi possível observar que a irradiação com a luz vermelha ou infravermelha separadamente, não foram suficientes para promover a osseointegração em níveis hiperglicêmicos.

Um estudo que comparou a aplicação dos comprimentos de onda 660nm e 830nm no reparo de fraturas em ratos, observou melhores resultados com o comprimento de onda vermelho, aos 14 dias pós operatórios³⁷. Entretanto essa diferença não foi observada com 21 dias, demonstrando que ambos os comprimentos de onda foram capazes de estimular a cicatrização óssea³⁷. Diante dos efeitos positivos demonstrados em estudos prévios, presume-se que a combinação dos dois comprimentos de onda tenha sido fundamental para os encontrados no presente estudo.

No presente estudo, o grupo que apresentou resultados significativos, foi exposto a maior quantidade de energia (4J). Um estudo *in vitro* observou que a dose com 3J de energia e 70mW de potência, proporcionou maior proliferação celular quando comparada a doses menores⁴⁰. Possivelmente maiores doses de energia sejam mais eficazes na osseointegração em animais diabéticos, entretanto, novos estudos são necessários para investigar esses protocolos.

Observou-se no presente estudo, que os parâmetros Superfície óssea (BS), Espessura trabecular (Tb.Th), Separação trabecular (Tb.Sp) e Densidade de conectividade (Conn.D), não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Provavelmente, seja necessário um maior tempo de observação do experimento para constatar os efeitos da luz laser na maturação óssea de ratos diabéticos.

Este estudo apresenta limitações pertinentes ao modelo experimental em animais, no qual não é possível extrapolar os resultados para humanos. Porém, os resultados promissores encontrados, podem sugerir a necessidade de novos estudos que investiguem a fotobiomodulação na osseointegração em diabéticos com maiores períodos de observação experimental.

Conclusões

Dentro das limitações deste estudo, os resultados demonstraram que a fotobiomodulação com luz laser de baixa intensidade utilizando emissão simultânea de dois comprimentos de onda (660nm e 808nm), contribuiu para o aumento de percentual ósseo e número de trabéculas ósseas. Desta forma, favoreceu a osseointegração de implantes dentários em ratos diabéticos.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pela Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), pelo Centro Educacional de Ensino Superior de Patos (FIP-CG) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

1. Jemt T. A retro-prospective effectiveness study on 3448 implant operations at one referral clinic: A multifactorial analysis. Part II: Clinical factors associated to peri-implantitis surgery and late implant failures. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2017;19(6):972-979.
2. Buser D, Sennerby L, de Bruyn H. Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress, current trends and open questions. *Periodontol 2000.* 2017; 73(1): 7-21.

3. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1969;3(2):81-100.
4. Naujokat H, Kunzendorf B, Wiltfang J. Dental implants and diabetes mellitus-a systematic review. *Int J Implant Dent.* 2016;2(1):5.
5. Raikar S, Talukdar P, Kumari S, Panda SK, Oommen VM, Prasad A. Factors affecting the survival rate of dental implants: A retrospective study. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2017;7(6):351-355.
6. Aghaloo T, Pi-Anfruns J, Moshaverinia A, Sim D, Grogan T, Hadaya D. The effects of systemic diseases and medications on implant osseointegration: A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2019;34:s35-s49.
7. International diabetes federation. IDF diabetes Atlas 9th Edition, 2019. Disponible in: <https://www.diabetesatlas.org/en/resources/>
8. Costa AF, Flor LS, Campos MR, et al. Burden of type 2 diabetes mellitus in Brazil. *Cad Saude Publica.* 2017;33(2):e00197915.
9. Jiao H, Xiao E, Graves DT. Diabetes and its effect on bone and fracture healing. *Curr Osteoporos Rep.* 2015;13(5):327-335.
10. Kalaitzoglou E, Popescu I, Bunn RC, Fowlkes JL, Thrailkill KM. Effects of type 1 diabetes on osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Curr Osteoporos Rep.* 2016;14(6):310-319.
11. Carroll JD, Milward MR, Cooper PR, Hadis M, Palin WM. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. *Dent Mater.* 2014;30(5):465-475.
12. Saygun I, Nizam N, Ural AU, Serdar MA, Avcu F, Tözüm TF. Low-level laser irradiation affects the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I), and receptor of IGF-I (IGFBP3) from osteoblasts. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(3):149-154.
13. Pezelj-Ribarić S, Kqiku L, Brumini G, et al. Proinflammatory cytokine levels in saliva in patients with burning mouth syndrome before and after treatment with low-level laser therapy. *Lasers Med Sci.* 2013;28(1):297-301.
14. Casalechi HL, Leal-Junior EC, Xavier M, et al. Low-level laser therapy in experimental model of collagenase-induced tendinitis in rats: effects in acute and chronic inflammatory phases. *Lasers Med Sci.* 2013;28(3):989-995.
15. Prados-Frutos JC, Rodríguez-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):383-392.

16. López-Ramírez M, Vílchez-Pérez MA, Gargallo-Albiol J, Arnabat-Domínguez J, Gay-Escoda C. Efficacy of low-level laser therapy in the management of pain, facial swelling, and postoperative trismus after a lower third molar extraction. A preliminary study. *Lasers Med Sci.* 2012;27(3):559-566.
17. Ferrante M, Petrini M, Trentini P, Perfetti G, Spoto G. Effect of low-level laser therapy after extraction of impacted lower third molars. *Lasers Med Sci.* 2013;28(3):845-849.
18. Asutay F, Ozcan-Kucuk A, Alan H, Koparal M. Three-dimensional evaluation of the effect of low-level laser therapy on facial swelling after lower third molar surgery: A randomized, placebo-controlled study. *Niger J Clin Pract.* 2018;21(9):1107-1113.
19. Nemţoi A, Trandafir V, Paşca AS, et al. Osseointegration of chemically modified sandblasted and acid-etched titanium implant surface in diabetic rats: a histological and scanning electron microscopy study. *Rom J Morphol Embryol.* 2017;58(3):881-886.
20. Liu X, Tan N, Zhou Y, et al. Delivery of antagomiR204-conjugated gold nanoparticles from PLGA sheets and its implication in promoting osseointegration of titanium implant in type 2 diabetes mellitus. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:7089-7101.
21. Bautista CRG, Santos IVD, Moraes RM, et al. Sitagliptin's effects on bone tissue and osseointegration in diabetic rats. *Arch Oral Biol.* 2019;102:238-243.
22. Cirano FR, Pimentel SP, Casati MZ, et al. Effect of curcumin on bone tissue in the diabetic rat: repair of peri-implant and critical-sized defects. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2018;47(11):1495-1503.
23. ELSyad MA, Abdraboh AE, Aboelnagga MM, Ghali RM, Lebshtien IT. Effect of Low-Level Laser Irradiation on Stability and Marginal Bone of Narrow Implants Retaining Overdentures in Moderately Controlled Diabetic Patients. *J Oral Implantol.* 2019;45(5):391-397.
24. Kim HY. Statistical notes for clinical researchers: assessing normal distribution (2) using skewness and kurtosis. *Restor Dent Endod.* 2013;38(1):52-54.
25. de Morais JA, Trindade-Suedam IK, Pepato MT, Marcantonio E Jr, Wenzel A, Scaf G. Effect of diabetes mellitus and insulin therapy on bone density around osseointegrated dental implants: a digital subtraction radiography study in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(8):796-801.
26. Luo H, Pan W, Sloan F, Feinglos M, Wu B. Forty-year trends in tooth loss among american adults with and without diabetes mellitus: An age-period-cohort analysis. *Prev Chronic Dis.* 2015;12:E211.

27. Annibaldi S, Pranno N, Cristalli MP, La Monaca G, Polimeni A. Survival analysis of implant in patients with diabetes mellitus: A systematic review. *Implant Dent*. 2016;25(5):663-674.
28. Oh SM, Shin JS, Kim IK, et al. Therapeutic effects of hif-1 α on bone formation around implants in diabetic mice using cell-penetrating dna-binding protein. *Molecules*. 2019;24(4):760.
29. Marques L, Holgado LA, Francischone LA, Ximenez JP, Okamoto R, Kinoshita A. New LLLT protocol to speed up the bone healing process-histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. *Lasers Med Sci*. 2015;30(4):1225-1230.
30. Mayer L, Gomes FV, de Oliveira MG, de Moraes JF, Carlsson L. Peri-implant osseointegration after low-level laser therapy: micro-computed tomography and resonance frequency analysis in an animal model. *Lasers Med Sci*. 2016;31(9):1789-1795.
31. Kim JR, Kim SH, Kim IR, Park BS, Kim YD. Low-level laser therapy affects osseointegration in titanium implants: resonance frequency, removal torque, and histomorphometric analysis in rabbits. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2016;42(1):2-8.
32. 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 osseointegration of dental implants. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(15):2520-2527.
33. Zein R, Selting W, Benedicenti S. Effect of low-level laser therapy on bone regeneration during osseointegration and bone graft. *Photomed Laser Surg*. 2017;35(12):649-658.
34. Barbos Pinheiro AL, Limeira Júnior Fde A, Márquez Gerbi ME, et al. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. *J Clin Laser Med Surg*. 2003;21(6):383-388.
35. Gerbi ME, Pinheiro AL, Marzola C, et al. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830 nm. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(4):382-388.
36. Nicola RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MT, dos Reis LM, Zângaro RA. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci*. 2003;18(2):89-94.
37. Quirk BJ, Sannagowdara K, Buchmann EV, Jensen ES, Gregg DC, Whelan HT. Effect of near-infrared light on in vitro cellular ATP production of osteoblasts and fibroblasts and on fracture healing with intramedullary fixation. *J Clin Orthop Trauma*. 2016;7(4):234-241.

38. de Vasconcellos LM, Barbara MA, Rovai ES, et al. Titanium scaffold osteogenesis in healthy and osteoporotic rats is improved by the use of low-level laser therapy (GaAlAs) Lasers Med Sci. 2016;31(5):899-905
39. Tani A, Chellini F, Giannelli M, Nosi D, Zecchi-Orlandini S, Sassoli C. Red (635 nm), near-infrared (808 nm) and violet-blue (405 nm) photobiomodulation potentiality on human osteoblasts and mesenchymal stromal cells: A morphological and molecular in vitro study. Int J Mol Sci. 2018;19(7):1946.
40. Huertas RM, Luna-Bertos ED, Ramos-Torrecillas J, Leyva FM, Ruiz C, García-Martínez O. Effect and clinical implications of the low-energy diode laser on bone cell proliferation. Biol Res Nurs. 2014;16(2):191-196.

Tabela 1 - Comparação da morfometria e densidade óssea entre os grupos propostos.

	Grupos				p-valor
	Combinado	Infravermelho	Vermelho	Controle	
	M (DP)	M (DP)	M (DP)	M (DP)	
Percentual de Volume ósseo (BV/TV)	25,81 (4,02) ^A	18,37 (4,05) ^B	18,49 (2,90) ^B	17,61 (2,56) ^B	0,002
Superfície Óssea (BS)	185,64 (50,21) ^A	185,80 (57,23) ^A	190,94 (38,57) ^A	178,11 (42,44) ^A	0,969
Número Trabecular (Tb.N)	2,14 (0,29) ^A	1,50 (0,59) ^B	1,46 (0,27) ^B	1,33 (0,28) ^B	0,008
Espessura Trabecular (Tb.Th)	0,12 (0,02) ^A	0,12 (0,02) ^A	0,12 (0,02) ^A	0,13 (0,01) ^A	0,902
Separação Trabecular (Tb.Sp)	0,26 (0,06) ^A	0,30 (0,05) ^A	0,29 (0,03) ^A	0,31 (0,02) ^A	0,383
Densidade de Conectividade (Conn.D)	473,93 (95,83) ^A	484,61 (112,76) ^A	509,64 (109,71) ^A	500,61 (83,88) ^A	0,929

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020. *Teste ANOVA one-way com teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que a fotobiomodulação com luz laser de baixa intensidade com emissão simultânea de dois comprimentos de onda (660nm e 808nm), favoreceu a osseointegração de implantes dentários em ratos diabéticos. Estes resultados são promissores e podem nortear novos estudos que utilizem um maior tempo de observação para avaliar as características de maturação óssea. Além disso, sugere-se que estudos clínicos randomizados estabeleçam um protocolo eficaz em humanos, que possa contribuir para a reabilitação de pacientes diabéticos.

REFERÊNCIAS

- AGHALOO, T.; PI-ANFRUNS, J.; MOSHAVERINIA, A.; SIM, D.; GROGAN, T.; HADAYA, D. The effects of systemic diseases and medications on implant osseointegration: A systematic review. **Int J Oral Maxillofac Implants**. v. 34, n., p. s35-s49, 2019.
- ALBREKTSSON, T.; JACOBSSON, M. Bone-metal interface in osseointegration. **The Journal of Prosthetic Dentistry**. v. 57, n. 5, p. 597–607, 1987.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 36, n. 1, p. S67-S74, 2013.
- ANNIBALI, S.; PRANNO, N.; CRISTALLI, M.P.; et al. Survival analysis of implant in patients with diabetes mellitus: A systematic review. **Implant Dentistry**. v. 25, p. 663–674, 2016.
- ASUTAY, F.; OZCAN-KUCUK, A.; ALAN, H.; KOPARAL M. Three-dimensional evaluation of the effect of low-level laser therapy on facial swelling after lower third molar surgery: A randomized, placebo-controlled study. **Nigerian Journal of Clinical Practice**. v. 21, n. 9, p. 1107-1113, 2018.
- BERTOLDI, A.D.; KANAVOS, P.; FRANÇA, G.V.; CARRARO, A.; TEJADA, C.A.; HALLAL, P.C.; et al. Epidemiology, management, complications and costs associated with type 2 diabetes in Brazil: a comprehensive literature review. **Global Health**. v. 9, n. 62, 2013.
- BLAY, A.; BLAY, C.C.; TUNCHEL, S.; GEHRKE, S.A.; SHIBLI, J.A.; GROTH, E.B.; ZECELL, D.M. Effects of a low-intensity laser on dental implant osseointegration: Removal torque and resonance frequency analysis in rabbits. **Oral Implantology**. v. 42, n. 4, p. 316-20, 2016.
- BOLDRINI, C.; DE ALMEIDA, J.M.; FERNANDES, L.A.; RIBEIRO, F.S.; GARCIA, V.G.; THEODORO, L.H.; PONTES, A.E. Biomechanical effect of one session of low-level laser on the bone-titanium implant interface. **Lasers in Medical Science**. v. 28, n. 1, p. 349–52, 2013.
- BOUXSEIN, M.L.; BOYD, S.K.; CHRISTIANSEN, B.A.; GULDBERG, R.E.; JEPSEN, K.J.; MÜLLER, R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**. v. 25, n. 7, p. 1468–1486, 2010.
- BRÅNEMARK, P.I.; ADELL, R.; ALBREKTSSON, T.; LEKHOLM, U.; LUNDKVIST, S.; ROCKLER, B. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. **Biomaterials**. v. 4, n. 1, p. 25-8, 1983.
- BRÅNEMARK, P.I.; ADELL, R.; BREINE, U.; HANSSON, B.O.; LINDSTRÖM, J.; OHLSSON, A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. **Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery**. v. 3, n. 2, p. 81-100, 1969.

BUSER, D.; SENNERBY, L.; DE BRUYN, H. Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress, current trends and open questions. **Periodontology** 2000. v. 73, n. 1, p. 7-21, 2017.

CAKARER, S.; SELVI, F.; CAN, T.; et al. Investigation of the risk factors associated with the survival rate of dental implants. **Implant Dentistry**. v. 23, p. 328–333, 2014.

DE CASTRO, J.F.; ABREU, E.G.; CORREIA, A.V.; DA MOTA VASCONCELOS BRASIL, C.; DA CRUZ PEREZ, D.E.; DE PAULA RAMOS PEDROSA, F. Low-level laser in prevention and treatment of oral mucositis in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. **Photomedicine Laser Surgery**. v. 31, n. 12, p. 613–8, 2013.

DEGIDI, M.; NARDI, D.; PIATTELLI, A. 10-year follow-up of immediately loaded implants with TiUnite porous anodized surface. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**. v. 14, p. 828–838, 2012.

ELSYAD MA, ABDRABOH AE, ABOELNAGGA MM, GHALI RM, LEBSHTIEN IT. Effect of Low-Level Laser Irradiation on Stability and Marginal Bone of Narrow Implants Retaining Overdentures in Moderately Controlled Diabetic Patients. **Journal of Oral Implantology**. v. 45, n. 5, p. 391-397, 2019.

ESHGHPOUR, M.; AHRARI, F.; NAJJARKAR, N.T.; KHAJAVI, M.A. Comparison of the effect of low level laser therapy with Alvogyl on the management of alveolar osteitis. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**. v. 20, n. 3, p. e386–92, 2015.

FARHADI, F.; ESLAMI, H.; MAJIDI, A.; FAKHRZADEH, V.; GHANIZADEH, M.; KHADEMNEGHAD, S. Evaluation of adjunctive effect of low-level laser Therapy on pain, swelling and trismus after surgical removal of impacted lower third molar: A double blind randomized clinical trial. **Laser Therapy**. v. 26, n. 3, p. 181-187, 2017.

FERRANTE, M.; PETRINI, M.; TRENTINI, P.; PERFETTI, G.; SPOTO, G. Effect of low-level laser therapy after extraction of impacted lower third molars. **Lasers in Medical Science**. v. 28, p. 845-9, 2013.

FISCHER, K.; STENBERG, T. Prospective 10-year cohort study based on a randomized controlled trial (RCT) on implant supported full-arch maxillary prostheses. Part 1: sandblasted and acid-etched implants and mucosal tissue. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**. v. 14, p. 808–815, 2012.

GOMES, F.V.; MAYER, L.; MASSOTTI, F.P.; BARALDI, C.E.; PONZONI, D.; WEBBER, J.B.; DE OLIVEIRA, M.G. Low-level laser therapy improves peri-implant bone formation: resonance frequency, electron microscopy, and stereology findings in a rabbit model. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 44, n. 2, p. 245-51, 2015.

GOTFREDSEN, K. A 10-year prospective study of single tooth implants placed in the anterior maxilla. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**. v. 14, p. 80–87, 2012.

IRIE, M.S.; RABELO, G.D.; SPIN-NETO, R.; DECHICHI, P.; BORGES, J.S.; SOARES, P.B.F. Use of Micro-Computed Tomography for Bone Evaluation in Dentistry. **Brazilian Dental Journal**. v. 29, n. 3, p. 227-238, 2018.

KATYAYAN, P.A.; KATYAYAN, M.; SHAH, R.J. Rehabilitative considerations for dental implants in the diabetic patient. **The Journal of Indian Prosthodontic Society**. v. 13, n. 3, p. 175–183, 2013.

KERNER, W.; BRÜCKEL, J. German Diabetes Association. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. v. 122, n. 7, p. 384–386, 2014.

KIM, J.R.; KIM, S.H.; KIM, I.R.; PARK, B.S.; KIM, Y.D. Low-level laser therapy affects osseointegration in titanium implants: resonance frequency, removal torque, and histomorphometric analysis in rabbits. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**. v. 42, n. 1, p. 2–8, 2016.

KOPARAL, M.; KUCUK, A.O.; HILAL, A.; FATIH, A.; MEHMET, A.; Effects of low-level laser therapy following surgical extraction of the lower third molar with objective measurement of swelling using a three-dimensional system. **Experimental and Therapeutic Medicine**. v. 15, n. 3, p. 3820–3826, 2018.

LÓPEZ-RAMÍREZ, M.; VÍLCHEZ-PÉREZ, M.A.; GARGALLO-ALBIOL, J.; ARNABAT-DOMÍNGUEZ, J.; GAY-ESCODA, C. Efficacy of low-level laser therapy in the management of pain, facial swelling, and postoperative trismus after a lower third molar extraction. A preliminary study. **Lasers in Medical Science**. v. 27, p. 559–66, 2012.

LUO, H.; PAN, W.; SLOAN, F.; et al. Forty year trends in tooth loss among American adults with and without diabetes mellitus: An age-period-Cohort analysis. **Preventing Chronic Disease**. v. 12, e211, 2015.

MASSOTTI, F.P.; GOMES, F.V.; MAYER, L.; DE OLIVEIRA, M. G.; BARALDI, C.E.; PONZONI, D.; PURICELLI, E. Histomorphometric assessment of the influence of low-level laser therapy on peri-implant tissue healing in the rabbit mandible. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**. v. 33, n. 3, p. 123–128, 2015.

MAYER, L.; GOMES, F.V.; DE OLIVEIRA, M.G.; DE MORAES, J.F.; CARLSSON, L. Peri-implant osseointegration after low-level laser therapy: micro-computed tomography and resonance frequency analysis in an animal model. **Lasers in Medical Science**. v. 31, n. 9, p. 1789–1795, 2016.

MOOSAVI, H.; MALEKNEJAD, F.; SHARIFI, M.; AHRARI, F. A randomized clinical trial of the effect of low-level laser therapy before composite placement on postoperative sensitivity in class V restorations. **Lasers in Medical Science**. v. 30, n. 4, p. 1245–9, 2015.

NAGAHISA, K.; ARAI, K.; BABA, S. Study on oral health-related quality of life in patients after dental implant treatment with patient-reported outcome. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**. v. 33, n. 5, p. 1141–1148, 2018.

OH, S.M.; SHIN, J.S.; KIM, I.K.; KIM, J.H.; MOON, J.S.; LEE, S.K.; LEE, J.H. Therapeutic effects of hif-1 α on bone formation around implants in diabetic mice using cell-penetrating dna-binding protein. **Molecules**. v. 24, n. 4, p. 760, 2019.

PINHEIRO ALB, GERBI MEM. Photoengineering of bone repair processes. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 24, n. 2, p. 169–178, 2006.

PRADOS-FRUTOS, J.C.; RODRÍGUEZ-MOLINERO, J.; PRADOS-PRIVADO, M.; TORRES, J.H.; ROJO, R. Lack of clinical evidence on low-level laser therapy (LLL) on dental titanium implant: a systematic review. **Lasers in Medical Science**. v. 31, n. 2, p. 383–92, 2016.

RAIKAR, S.; TALUKDAR, P.; KUMARI, S.; PANDA, S.K.; OOMMEN, V.M.; PRASAD, A. Factors affecting the survival rate of dental implants: A retrospective study. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**. v. 7, n. 6, p. 351–355, 2017.

REN, C.; MCGRATH, C.; YANG, Y. The effectiveness of low-level diode laser therapy on orthodontic pain management: a systematic review and meta-analysis. **Lasers in Medical Science**. v. 30, n. 7, p. 1881–93, 2015.

SALINA, S.; MAJORANA, C.; LEZZI, G.; COLOMBO, A.; FONTANA, F.; PIATTELLI, A. Histological evaluation, in rabbit tibiae, of osseointegration of mini-implants in sites prepared with er:yag laser versus sites prepared with traditional burs. **Journal of Long-Term Effects of Medical Implants**. v. 16, n. 2, p. 145–156, 2006.

SÁNCHEZ-SILES, M.; BALLESTER-FERRANDIS, J.F.; SALAZAR-SÁNCHEZ, N.; GÓMEZ-GARCÍA, F.J.; MORALEJA-RUIZ, R.; CAMACHO-ALONSO, F. Long-term evaluation of quality of life and satisfaction between implant bar overdentures and conventional complete dentures: A 23 years retrospective study. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**. v. 20, n. 2, p. 208–214, 2017.

SMEETS, R.; STADLINGER, B.; SCHWARZ, F.; BECK-BROICHSITTER, B.; JUNG, O.; PRECHT, C.; KLOSS, F. et al. Impact of dental implant surface modifications on osseointegration. **BioMed Research International**. v. 2016, p. 6285620, 2016.

TENIS, C.A.; MARTINS, M.D.; GONÇALVES, M.L.L.; SILVA, D.F.T.D.; CUNHA FILHO, J.J.D.; MARTINS M.A.T.; et al. Efficacy of diode-emitting diode (LED) photobiomodulation in pain management, facial edema, trismus, and quality of life after extraction of retained lower third molars: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Medicine (Baltimore)**. v. 97, n. 37, p. e12264, 2018.

VON WILMOWSKY, C.; MOEST, T.; NKENKE, E.; STELZLE, F.; SCHLEGEL, K.A. Implants in bone: part I. A current overview about tissue response, surface modifications and future perspectives. **Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 18, n. 3, p. 243–257, 2014.

ZAYED, S.M.; HAKIM, A.A.A. Clinical efficacy of photobiomodulation on dental implant osseointegration: a systematic review. **Saudi Journal of Medicine and Medical Sciences**. v. 8, n. 2, p. 80–86, 2020.

ZEIN, R.; SELTING, W.; BENEDICENTI, S. Effect of low-level laser therapy on bone regeneration during osseointegration and bone graft. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**. v. 35, n. 12, p. 649–658, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE C - TERMO DE COMPROMISSO DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL**TERMO DE COMPROMISSO DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL EM CUMPRIR OS TERMOS DA LEI 11.794/08 DO CONCEA**

Pesquisa: Avaliação dos efeitos da fotobiomodulação na osseointegração de implantes em ratos diabéticos

Eu, Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão, Professora do Curso de Odontologia, da Universidade Estadual da Paraíba, portador (a) do RG: 334.874 SSP/PB e CPF: 205.769.434-87 comprometo-me em cumprir integralmente as diretrizes da lei N° 11.794/08 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, que dispõe sobre Ética em Pesquisa que envolve Animais.

Estou ciente das penalidades que poderei sofrer caso infrinja qualquer um dos itens da referida resolução. Por verdade, assino o presente compromisso.

Campina Grande/PB, 15 de julho de 2019.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão', is written over a horizontal line.

Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão
(Pesquisadora Responsável)

APÊNDICE D - TERMO DE CONCORDÂNCIA COM O PROJETO DE PESQUISA**TERMO DE CONCORDÂNCIA COM O PROJETO DE PESQUISA**

Pesquisa: Avaliação dos efeitos da fotobiomodulação na osseointegração de implantes em ratos diabéticos

Eu, **Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão**, Pesquisadora responsável, Professora de Pós-Graduação de Odontologia, da Universidade Estadual da Paraíba, portadora do RG: 334874-SSP/PB e CPF: 205769434-87 declaro que estou ciente do referido Projeto de Pesquisa e comprometo-me em acompanhar seu desenvolvimento no sentido de que se possam cumprir integralmente as diretrizes da Lei Nº11.794/08 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, que dispõe sobre Ética em Pesquisa que envolve Animais.

Campina Grande/PB, 15 de julho de 2019.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão', written over a horizontal line.

Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão
Orientadora

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jhonatan Thiago Lacerda Santos', written over a horizontal line.

Jhonatan Thiago Lacerda Santos
Orientando

ANEXOS

ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Campina Grande
Centro de Saúde e Tecnologia Rural
Comissão de Ética no Uso de Animais
Av. Santa Cecília, s/n, Bairro Jatobá, Rodovia
Patos,
CEP: 58700-970, Cx postal 64, Tel. (83) 3511-3045



A(o): Dr (ª). **Jhonatan Thiago Lacerda Santos**

Protocolo CEUA/CSTR N° 116/2019

CERTIDÃO

Certificamos para os devidos fins que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DENTÁRIOS EM RATOS DIABÉTICOS", coordenado pelo (a) pesquisado(a) acima citado (a), obteve parecer consubstanciado pelo regulamento interno deste comitê, sendo **APROVADO**, em caráter de **ad referendum**, estando a luz das normas e regulamento vigentes no país atendidas as pesquisas para especificações científicas.

Patos, 23 de Outubro de 2019.

Maria de Fátima de Araújo Lucena
Coordenadora do CEP/CEUA/UFCG/Patos

ANEXO B - NORMAS DE SUBMISSÃO À REVISTA *DENTOMAXILLOFACIAL RADIOLOGY*

Research Articles

Research articles should describe your novel original research in a clear, reproducible way. Research articles should be no more than 7000 words, with generally no more than 50 references.

The abstract for research articles should be constructed under the following subheadings:

- Objectives;
- Methods;
- Results;
- Conclusions;

More information on preparing your submission can be found here.

- You should give sufficient background to your work and the reference list should be representative of the field.
- The method should be described clearly.
- Any limitations of the work should be addressed and discussed.
- The conclusions drawn should be consistent with the results obtained.
- The images included should be clear enough such that the work can be understood.
- Any ethical approval statements should be included where relevant.
- Appropriate statistical analysis of results should be carried out where relevant.

Preparing your submission

For guidelines regarding word count, figure/table count and references for all DMFR article types see here.

Authors' names and affiliations should not appear anywhere on the manuscript pages or the images (to ensure blind peer-review).

Teeth should be designated in the text using the full English terminology. In tables and figures individual teeth can be identified using the FDI two-digit system, i.e. tooth 13 is the first permanent canine in the right maxilla region.

- Author contribution statement

- Title page
- Abstract
- Main text
- References
- Tables
- Figures
- Appendices
- Supplementary material
- Units, symbols and statistics

Author contribution statement

DMFR requires that an author contribution statement accompany each submission, outlining the contributions of each author towards the work. A template statement can be downloaded [here](#).

DMFR requires that for all submitted papers:

- All the authors have made substantive contributions to the article and assume full responsibility for its content; and
- All those who have made substantive contributions to the article have been named as authors.

The International Committee of Medical Journal Editors recommends the following definition for an author of a work, which we ask our authors to adhere to:

Authorship be based on the following 4 criteria [1]:

- Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
- Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND
- Final approval of the version to be published; AND
- Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

1 The International Committee of Medical Journal Editors, Roles and Responsibilities of Authors, Contributors, Reviewers, Editors, Publishers, and Owners: Defining the Role of Authors and Contributors, http://www.icmje.org/roles_a.html

Title page

The title page is a separate submission item to the main manuscript and should provide the following information:

- Title of the paper. Abbreviations other than CT or MRI should not be used in the title.
- A shortened version of the title (no more than 70 characters in length, including spaces) should be provided for use as the running head. Abbreviations are permissible.
- Type of Manuscript (see all types of manuscript)
- Author names should appear in full (in the format: "first name, initial(s), last name), qualifications and affiliations.
- Statement indicating any source of funding or financial interest where relevant should be included.
- A cover letter or statement can be included into the title page, but please note this is not a compulsory item.

Blind title page

A blind title page should be included with the full manuscript, giving only the title (i.e. without the authors' names and affiliations), for use in the peer-review process.

Abstract

The abstract should be an accurate and succinct summary of the paper, not exceeding 250 words. For papers containing research: the abstract should be constructed under the following subheadings:

- Objectives;
- Methods;
- Results;
- Conclusions.

These subheadings should appear in the text of the abstract and the abstract should not contain references. The abstract should: indicate the specific objective or purpose of the article; describe the methods used to achieve the objective, stating what was done and how it was done; present

the findings of the methods described – key statistics should be included; present the conclusion of the study based solely on the data provided, and highlight the novelty of the work.

Beneath the abstract please select up to 5 keywords from the current Medical Subject Headings (MeSH).

Main text

Please organise your paper in a logical structure with clear subheadings to indicate relevant sections. It is up to the authors to decide the specific nature of any subheadings as they see fit.

Research papers typically follow the structure:

- Introductory section;
- Methods and materials/patients;
- Results;
- Discussion;
- Conclusion;
- Acknowledgments (if relevant).

Present results in a clear logical sequence. The conclusions drawn should be supported by the results obtained and the discussion section should comment critically on the findings and conclusions as well as any limitations of the work.

Acknowledgments should be brief and should indicate any potential conflicts of interest and sources of financial support.

An appendix may be used for mathematical formulae or method details of interest to readers with specialist knowledge of the area.

In addition:

- Avoid repetition between sections.
- Avoid repetition of text featured in tables and the main body of the article.
- Abbreviations and acronyms may be used where appropriate, but must always be defined where first used.
- The names and locations (town, country) of manufacturers of all equipment and non-generic drugs must be given.
- Avoid the use of footnotes.
- Use SI units throughout the text (Grays, Sieverts not RADs and REMs).

References

- Authors are responsible for the accuracy of the references. Only papers closely related to the work should be cited; exhaustive lists should be avoided. All references must appear both in the text and the reference list.
- References should follow the Vancouver format.
- In the text, references are cited in numerical order as superscript numbers starting at 1. The superscript numbers are placed AFTER the full point.
- At the end of the paper they should be listed (double-spaced) in numerical order corresponding to the order of citation in the text.
- A reference cited in a table or figure caption counts as being cited where the table or figure is first mentioned in the text.
- Papers in press may be included in the list of references.
- Do not include references to uncompleted work or work that has not yet been accepted for publication. Abstracts and/or papers presented at meetings not in the public domain should not be included as references.
- References to private communications should be given only in the text (i.e. no number allocated). The author and year should be provided.
- If there are 6 or fewer authors, list them all. If there are 7 or more, list the first 6 followed by et al.
- Abbreviations for titles of medical periodicals should conform to those used in the latest edition of Index Medicus.
- The first and last page numbers for each reference should be provided.
- Abstracts and letters must be identified as such.

Examples of references:

Journal article:

Gardner DG, Kessler HP, Morency R, Schaffner DL. The glandular odontogenic cyst: an apparent entity. *J Oral Pathol* 1988; 17:359–366.

Journal article, in press:

Dufoo S, Maupome G, Diez-de-Bonilla J. Caries experience in a selected patient population in Mexico City. *Community Dent Oral Epidemiol* (in press).

Complete book:

Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. *Histological typing of odontogenic tumours* (2nd edn). Berlin: Springer Verlag, 1992.

Chapter in book:

DelBalso AM, Ellis GE, Hartman KS, Langlais RP. Diagnostic imaging of the salivary glands and periglandular regions. In: DelBalso AM (ed). Maxillofacial imaging. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1990, pp 409–510.

Abstract:

Mileman PA, Espelid I. Radiographic treatment decisions - a comparison between Dutch and Norwegian practitioners. *J Dent Res* 1986; 65: 609 (Abstr 32).

Letter to the Editor:

Gomez RS, de Oliveira JR, Castro WH. Spontaneous regression of a paradental cyst. *Dentomaxillofac Radiol* 2001; 30: 296 (letter).

Journal article on the internet:

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>.

Homepage/Web site:

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

Tables

Tables should be referred to specifically in the text of the paper but provided as separate files. Number tables consecutively with Arabic numerals (1, 2, 3, etc.), in the order in which they appear in the text.

- Give each table a short descriptive title.
- Make tables self-explanatory and do not duplicate data given in the text or figures.
- Aim for maximum clarity when arranging data in tables. Where practicable, confine entries in tables to one line (row) in the table, e.g. “value (\pm sd) (range)” on a single line is preferred to stacking each entry on three separate lines.
- Ensure that all columns and rows are properly aligned.
- Include horizontal rules at the top and bottom of a table and one below the column headings. If a column heading encompasses two or more subheadings, then the main headings and subheadings should be separated by a single short rule. No other rules should be included, neither horizontal nor vertical.

- Appropriate space should be used to separate columns. Rows should be double-spaced.
- A table may have footnotes if necessary. These should be referred to within the table by superscript letters, which will then also be given at the beginning of the relevant footnote. Begin each footnote on a new line. A general footnote referring to the whole table does not require a superscript letter.
- Define abbreviations in tables in the footnotes even if defined in the text or a previous table.
- Submit tables as editable text.

Figures

Figures should be referred to specifically in the text of the paper.

- Number figures consecutively using Arabic numerals (1, 2, 3, etc.) and any figure that has multiple parts should be labelled alphabetically (e.g. 2a, 2b).
- Concise, numbered legend(s) should be listed on a separate sheet. Avoid repeating material from the text.
- Abbreviations used in figures should be defined in the caption.
- Labelling of artwork should be Arial 8 point font.
- Ideally, figure sizes should be 84 mm wide, 175 mm wide or the intermediate width of 130 mm.

Files

Supply image files in EPS, TIFF, PDF or JPEG format.

TIFF is preferred for halftones, i.e. medical images such as radiographs, MR scans etc.

EPS is preferred for drawn artwork (line drawings and graphs).

For JPEG files, it is essential to save at maximum quality, i.e. "10", to ensure that quality is satisfactory when the files are eventually decompressed.

Files supplied in Word, PowerPoint or Excel may prove acceptable, but please supply in EPS, TIFF or JPEG if practicable. Other formats will not be usable.

Do not supply GIF files – GIF is a compressed format that can cause quality problems when printed.

Upload each figure separately and numbered.

Colour

Unless essential to the content of the article, all illustrations should be supplied in black and white with no colour (RGB, CMYK or Pantone references) contained within them.

The cost of reproduction of colour images will be charged to the author at the following rates: £300 for one colour image, £500 for two colour images and £100 for each subsequent additional colour image. All prices are exclusive of UK VAT.

Images that do need to be reproduced in colour should be saved in CMYK, with no RGB or Pantone references contained within them.

Resolution

Files should be saved at the appropriate dpi (dots per inch) for the type of graphic (the typical screen value of 72 dpi will not yield satisfactory printed results). Lower resolutions will not be usable.

Line drawings – save at 800 dpi (or 1200 dpi for fine line work).

Halftone and colour work – save at 300 dpi.

Composition

The image should be cropped to show just the relevant area (i.e. no more than is necessary to illustrate the points made by the author whilst retaining sufficient anatomical landmarks). The amount of white space around the illustration should be kept to a minimum.

Supply illustrations at the size they are to be printed, usually 76 mm wide (single column of text) or for especially large figures 161 mm (two columns of text).

Annotations, e.g. arrows, should be used to indicate subtle but salient points. All annotations should be included within the images supplied.

Patient identification must be obscured.

Additional points to note:

Do not put a box around graphs, diagrams or other artwork.

Avoid background gridlines unless these are essential (e.g. confidence limits).

Fonts should be Adobe Type 1 standard – Helvetica or Times are preferred.

Ensure that lettering is appropriately sized – should correspond to 8 or 9 pt when printed.

Include all units of measurement on axes.

All lines (e.g. graph axes) should have a minimum width of $\frac{1}{4}$ pt (0.1 mm) otherwise they will not print; 1 pt weight is preferable.

Avoid using tints (solid black and white or variations of crosshatching are preferred), but any tints that are used must be at a minimum 5% level to print (but do not use too high a tint as it may print too dark).

Do not use three-dimensional histograms when the addition of a third dimension gives no further information.

Appendices

Appendices should be used to include detailed background material that is essential for the understanding of the manuscript e.g. statistical analyses, very detailed preliminary studies, but which is too comprehensive to include as part of the main text.

Where possible, authors are encouraged to include all relevant material in the main body of the text, however, if an appendix is necessary it should be supplied as a separate file. If more than one appendix is included, these should be identified using different letters.

An appendix may contain references, but these should be listed separately and numbered A1, A2, etc. Appendices must be referred to in the main text in the relevant section.

Supplementary material

Supplemental material is intended for material that would add value to your manuscript but is not essential to the understanding of the work. Supplementary material is typically used for including material that can not be accommodated in print form, for example multimedia files such as dynamic images, video/audio files etc.

There are no restrictions on supplementary file formats, though it is recommended that authors choose file types that the majority of readers will be able to open e.g.

Text/Data: PDF, Word, Excel, Powerpoint, .txt

Graphics: TIF, PNG, JPEG, GIF

Video: AVI, MOV, MP4, MPEG, WMV

Audio: mp3, m4a

Units, symbols and statistics

Authors should use the International System of Units (SI) [1]. Units of radiation should be given in SI, e.g. 1 Sv, 1 Gy, 1 MBq. Exceptions are mmHg for blood pressure and g dl⁻¹ for haemoglobin. For guidance, authors can refer to the publication Units, Symbols and Abbreviations. A guide for medical and scientific authors [2].

All radiation factors (dose/time/fractionation) must be listed.

Equations should be numbered (1), (2) etc. to the right of the equation. Do not use punctuation after equations. Do not include dots to signify multiplication – parameters should simply be typed closed up, or with a multiplication sign if necessary to avoid ambiguity.

Statistical Guidelines

The aim of the study should be clearly described and a suitable design, incorporating an appropriate number of subjects, should be used to accomplish the aim. It is frequently beneficial to consult a professional statistician before undertaking a study to confirm it has adequate power, and presentation of a power calculation within the paper demonstrates the ability of the study to detect clinically or biologically meaningful effects.

Details should be provided on selection criteria, whether data were collected prospectively or retrospectively, and any exclusions or losses to follow-up that might affect the study population. Information on subject characteristics in groups being compared should be given for any factors that could potentially bias the comparison of the groups; such information is often best presented in a tabular format in which the groups are in adjacent columns. If the study was randomized, details of the randomization procedure should be included.

Measures of variation should be included for all important results. When means are presented, the standard deviation or the standard error of the mean should also be given, and it should be clear which of these two measures is being quoted. When medians are given, measures of variation such as the interquartile range or overall range should also be included. Estimates of differences, e.g. between two means being compared, should be provided with 95% confidence limits to aid the reader and author to interpret the results correctly. Note that estimation of the size of effects, e.g. treatment or prognostic factor effects, is as important as hypothesis testing.

Statistical procedures should be described and referenced for all p-values given, and the values from which they were derived should be included. The validity of statistical procedures should also be confirmed, e.g. the t-test requires normal distribution(s) in the basic data and the chi-squared test is not valid when the expected numbers in cells are less than 5. Data may sometimes be transformed, e.g. using a log or square root transformation, to achieve normality. Non-parametric tests should be used when the conditions for normality are not met. It should be noted, however, that the Wilcoxon signed rank test (the non-parametric equivalent of the paired

t-test) is semi-quantitative. If more than two groups are being compared then an analysis of variance should be performed before undertaking comparisons of pairs of groups. You are advised to seek the help of a professional statistician if you are uncertain of the appropriateness or interpretation of statistical methods.

Analysis of repeated measurements on the same subject can give rise to spurious results if comparisons are made at a large number of different time points. It is frequently preferable to represent each subject's outcome by a single summary measure chosen for its appropriateness. Examples of such measures are the area under the curve, the overall mean, the maximum or minimum, and the time to reach a given value. Simple statistics can then be applied to these summary measures.

The results of the evaluation of a test procedure should state clearly the criteria used to define positivity, and the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value should all be quoted together with their 95% confidence limits.

1. Goldman DT, Bell RJ, eds. *The International System of Units (SI)*. 5th edn. London, UK: HMSO; 1987.
2. Baron DN, ed. *Units, symbols and abbreviations. A guide for medical and scientific authors*. 5th edn. London, UK: Royal Society of Medicine Press; 1994.

Publishing ethics

The BIR's publishing ethics are in place to promote ethical publication practice across all our books, journals and any other publications. This page outlines our policies on the major ethical principles of academic publishing. The BIR is a member of COPE (Committee On Publication Ethics).

- Authorship
- Original data
- Declaration of funding source and conflicts of interest
- Author misconduct and article withdrawal
- Studies involving human and animal subjects
- Informed consent

Authorship

To be listed as an author, an individual should meet all four authorship criteria as defined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Equally, any individuals who meet these criteria should be included on the author list:

- "Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work"; AND
- "Drafting the work or revising it critically for important intellectual content"; AND
- "Final approval of the version to be published"; AND
- "Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved".

The ICMJE further states that "Acquisition of funding, the collection of data, or general supervision of the research group, by themselves, do not justify authorship." The BIR asks that authors fulfil the ICMJE requirements to be so listed.

On submitting an article all authors must agree to the terms and conditions of our Licence to Publish which warrants that 'all the Authors have made substantive contributions to the Article and assume full responsibility for its content.'

Individuals who do not meet all four criteria but who have made substantial contributions either to some of them or in other areas should be listed in the Acknowledgments.

Changing the list of authors

Once a manuscript has been received by the BIR, any changes in authorship will necessitate additional information:

Adding an author

The addition of an author requires that a 'confirmation of author status - addition' letter be signed and submitted to the editorial office by all authors, indicating agreement with both the addition and the placement of the proposed author in the listing of authors. The author's contribution information should also be provided.

Removing an author

The deletion of an author requires that a 'confirmation of author status - removal' letter be signed and submitted to the editorial office by all authors, including the one being removed, indicating agreement with the removal of the relevant author.

If the removed author is to be added to the Acknowledgments section, receipt of a signed 'confirmation of author status - removal' letter will be taken that all named authors agree to the same.

Original data

The Editors reserve the right to ask to inspect the raw data on which the results of a submitted article are based.

Declaration of funding source and conflicts of interest

Source of funding

We ask that authors always make clear the source of any funding for research work or towards publication of their article. This applies to all article types and all sources of funding, including government, private or commercial sources as well as funding towards publication support for an article such as funding towards our article processing charge for BIR|Open, colour charges or editorial assistance.

Conflicts of interest

Conflicts of interest are defined as those that, through their potential influence on behaviour or content or from perception of such potential influences, could undermine the objectivity, integrity or perceived value of publication.

We ask that the authors declare fully any conflicts of interest in their manuscript. A conflict of interest is an interest of the author(s) which may influence the objectivity, integrity and value of the publication.

Examples include:

- Employment by any organisation with a financial interest in or financial conflict with the publication of the article.
- Funding source – financial support by any organisation with a financial interest in or financial conflict with the publication of the article.

- Personal financial interests – financial interests such as stocks and shares in companies with a financial interest in or financial conflict with the publication of the article; consultation fees or other remuneration from organisations with a financial interest in or financial conflict with the publication of the article; patents or patent applications which may be affected by publication of the article.
- Membership to organisations with a financial interest in or financial conflict with the publication of the article.

If a reviewer or editor of a paper feels a conflict of interest in making a decision on a paper, the paper should be returned to the editorial office for transfer to another editor/reviewer.

Author misconduct and article withdrawal

Author misconduct

Author misconduct includes:

- fabrication or falsification of research results
- plagiarism
- submission of your manuscript to more than one journal at the same time
- redundant publications
- The BIR endorses the policies of the International Committee of Medical Journal

Editors and is a member of CrossCheck – the plagiarism detection initiative. All published articles have been screened using plagiarism detection software.

Article withdrawal, retraction, removal or replacement

Very occasionally circumstances may arise where an article published in BJR is affected by one of the issues above or may contain inaccurate data and must be withdrawn, retracted, removed or replaced. More detail on each of these processes is outlined below:

Article withdrawal:

This process is used for Advance articles – these are post-peer review versions of articles that have not yet undergone full copyediting and typesetting. These can occasionally contain errors, be submitted more than once in error or infringe our publishing ethics.

Article retraction:

Infringements of our publishing ethics as detailed above OR errors in submission/publication in a published, final version of an article will result in the article being retracted. A retraction notice written by the authors and or editors/editorial office detailing the reason for retraction will be published in a subsequent issue of the journal, with a link on the electronic version to the original version of the article.

Article removal:

Very rarely an article may need to be removed, such as in cases where the article poses a serious health risk, is defamatory, infringes on the legal rights of others or is the subject of a court order.

Article replacement:

This occurs where false or inaccurate data in the original article – which may pose a health risk – is replaced.

Studies involving human and animal subjects**Humans**

Research on human subjects submitted to BIR journals must have been carried out in accordance with the standards set out in the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans.

Authors should include a statement at the end of the manuscript clarifying that:

- such standards have been adhered to;
- the research procedures were approved by the responsible committee on human or animal experimentation (institutional or regional); and
- that informed consent was obtained for experimentation with human subjects.

N.B. Please note, if your research involves human subjects who may be identifiable from the images, data or details included in your paper you will need to obtain informed consent for publication. Read more about informed consent for publication [here](#).

Please ensure that all patient details are anonymised as much as possible in your manuscript before submitting, this includes images, names, initials, hospital numbers etc.

Animals

- Research on animal subjects submitted to BIR Journals must have been carried out in accordance with:
- the UK Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines; OR
- the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments; OR
- the latest edition of the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals.

Authors should include a statement at the end of the manuscript clarifying that:

- such standards have been adhered to; and
- the research procedures were approved by the responsible committee on human or animal experimentation (institutional or regional).

We encourage the use of and adherence to the ARRIVE guidelines when writing and submitting your animal research to BIR Journals. Authors may find the ARRIVE checklist useful when submitting.

Informed consent

Authors should make all efforts to anonymise/eliminate patient data/images/identifying details from their manuscript. Please refer to our informed consent policy for more details.

If there is any possibility that the patient can be identified in an illustration, photograph or other image, written informed consent for these details of the case to be published (incl. images, case history and data) must be obtained from the patient or a parent/guardian as appropriate and a line stating that this has been received must be included in the manuscript.

The BIR endorses the International Committee of Medical Journal Editors' policy on informed consent and full details can be found on their website.

The informed consent of all patients participating in reported trials for their case to be published (incl. images, case history and data) must be obtained and a statement to this effect must be included in submitted manuscripts, when relevant.