



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL
- DOUTORADO -

RENATO VALIATI

***ANÁLISE DO EFEITO DA LASERTERAPIA
NA INCORPORAÇÃO DE ALOENXERTOS
ÓSSEOS EM BLOCOS PROCESSADOS
POR CONGELAMENTO PROFUNDO
– ESTUDO EM COELHOS***

ANALYSIS OF THE EFFECT OF LASERTHERAPY IN INCORPORATION OF DEEP-
FROZEN BLOCKS BONE PROCESSED ALLOGRAFTS - STUDY IN RABBITS

PORTO ALEGRE – RS

2011

RENATO VALIATI

***ANÁLISE DO EFEITO DA LASERTERAPIA NA INCORPORAÇÃO DE ALOENXERTOS
ÓSSEOS EM BLOCOS PROCESSADOS POR CONGELAMENTO PROFUNDO – ESTUDO
EM COELHOS***

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli
- Orientador -

Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes
- Co-Orientador -

PORTO ALEGRE - RS

2011

RENATO VALIATI

***ANÁLISE DO EFEITO DA LASERTERAPIA NA INCORPORAÇÃO DE ALOENXERTOS
ÓSSEOS EM BLOCOS PROCESSADOS POR CONGELAMENTO PROFUNDO – ESTUDO
EM COELHOS***

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em 11 de março de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli – PUCRS

Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes - UDESC

Profª. Dra. Anelise Viapiana Masiero – UNIPLAC

Profª. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira - PUCRS

Prof. Dr. Angelo Luiz Freddo - UFRGS



Dedicatória

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos bens mais preciosos de minha vida:
meus filhos **Tainá** e **Renan** e minha esposa **Tania**.

Agradeço o apoio e a compreensão.



Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente aos meus Orientadores **Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli** e **Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes** e ao **Prof. Dr. Aldo Gava** pelo companheirismo, disponibilidade, confiança e estímulo durante esta trajetória.

A Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do magnífico reitor **Prof. Dr. Joaquim Clotet** e à Faculdade de Odontologia representada pelo diretor **Prof. Dr. Marco Túlio Mazzini de Carvalho**.

Aos **Prof. Dr. Jose Antônio Poli de Figueiredo**, coordenador do programa de Pós-graduação em Odontologia, e a **Profa. Dra. Nilza Pereira da Costa** pela dedicação a este curso.

A **Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)** por toda a estrutura disponibilizada em seu Hospital Veterinário, Biotério e Laboratório de Patologia Animal.

Aos Médicos Veterinários **Átila Costa**, **Ademir Cassiano da Rosa** e **Gabriel Pagano** pelo cuidado com os animais no pré, trans e pós-operatório. E a **Sandra Davi Travesso**, **Fernanda Jönck** e **Luciane Orbem Veronezi** pelo auxílio na confecção das lâminas histológicas e fotografias.

Ao **Centro de Microscopia e Microanálises (CEMM)** da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS) especialmente a **Profa. Berenice Dedavid**, e a técnica **Miriam** e a estagiária **Natália** que nos permitiram cursos de MEV, aprendizado e confecção de material para a pesquisa.

Aos **Professores Dr. Rogério Belle de Oliveira**, **Dra. Marília Gerhardt de Oliveira**, **Dr. Cláiton Heitz**, **Dra. Daniela Nascimento Silva** e **Dra. Maria Martha Campos** do programa de pós-graduação em Odontologia, nível de Doutorado, por compartilharem seus conhecimentos e suas experiências.

Ao **Prof. Dr. Vinicius Nery Viegas, Profa. Dra. Anelise Viapiana Masiero, Prof. Dr. Angelo Luiz Freddo, Prof. Christopher Corbelini** e ao **Prof. Dr. David José Miquelluti** por suas sugestões e conselhos.

Aos **Funcionários da Secretaria de Pós-graduação Ana Lúcia Silveira Prestes, Davenir Menger Bruschi, Marcos Caetano Correa e Paulo José da Silva** agradeço pelas orientações acadêmicas dispensadas.

A **Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC)** que me permitiu aprender com a docência e possibilitou a dispensa das atividades letivas durante o período do Doutorado.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** por viabilizar recursos para a realização deste Curso de Doutorado em Odontologia, área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Agradeço especialmente ao meu amigo **Jefferson Viapiana Paes** pelo apoio incondicional.

Aos meus colegas e amigos de curso **Marcelo Emir Requia Abreu, Leticia Kirst Post, Danilo Ibrahim e Vladimir Dourado Poli** agradeço pelo incentivo e companheirismo neste período em que convivemos em Porto Alegre.

Aos meus amigos **Carlos Alberto Medeiros Martins e Camila Araldi** que me acolheram com carinho na capital dos gaúchos.

Aos amigos **Michelle Agostini, Mário Romanach, Isabela Ramos e Izabella Barizon Matos** pelo apoio e incentivo.

Aos meus pais **Sady e Miraci** pelos incentivos e ensinamentos em todos os momentos de minha vida. Vocês são muito especiais.



Resumo

RESUMO

Objetivo: o objetivo deste estudo foi analisar o efeito da laserterapia de baixa potência no processo de incorporação óssea de aloenxertos em bloco com congelamento profundo. **Materiais e Métodos:** foram utilizados 14 coelhos: dois coelhos como doadores do tecido ósseo e 12 coelhos como receptores onde foram realizados aloenxertos e autoenxertos ósseos em bloco na calvária. Foram divididos em grupos com tratamento com laserterapia de baixa potência (aloenxerto e autoenxerto) e grupos controles (aloenxerto e autoenxerto) sem irradiação. Os animais foram mortos com 35 dias (n=6) e 70 dias (n=6). Os parâmetros de energia empregados foram: aplicação de laser de diodo (AsGaAl) – comprimento de onda de 830 nm - 4 J/cm² em quatro pontos sobre os blocos de enxertos perfazendo um total de 16 J/cm² por aplicação. A dose total do tratamento após as oito aplicações foi de 128 J/cm². **Resultados:** o aloenxerto ósseo processado por congelamento profundo associado à laserterapia de baixa potência apresentou incorporação na interface com o hospedeiro, remodelação óssea moderada, preenchimento parcial das lacunas osteocíticas, menor infiltrado inflamatório nos períodos iniciais e maior deposição de fibras colágenas quando comparado ao grupo controle. **Conclusão:** o aloenxerto ósseo processado por congelamento profundo associado à laserterapia de baixa potência é adequado como uma alternativa para o tratamento de defeitos ósseos. O processamento do osso alógeno pelo método de congelamento profundo mantém as características estruturais e de osteocondução do tecido ósseo.

Descritores¹: Aloenxerto. Transplante Alogênico. Homoenxerto. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. Criopreservação.

¹ Descritores em Ciências da Saúde (DeCS); disponível em <http://decs.bvs.br/>



Abstract

ABSTRACT

Objective: The purpose of this study was to analyze the effect of low level laser therapy (LLLT) in the process of bone incorporation of deep-frozen block allografts. **Materials and Methods:** A total of 14 rabbits: two rabbits as donors of bone tissue and 12 rabbits were performed as receivers bone blocks autografts and allografts in the calvária. They were divided into groups treated with low level laser therapy (allograft and autograft) and control groups (autograft and allograft) without irradiation. The animals were killed at 35 days (n = 6) and 70 days (n = 6). The energy parameters used were: application of diode laser (GaAlAs) - wavelength of 830 nm - 4 J/cm² at four points on the blocks of grafts for a total of 16 J/cm² per application. The total dose of treatment after eight applications was 128 J/cm². **Results:** The allograft bone processed by deep-freezing associated with LLLT showed incorporation at the graft-host interface, bone remodeling moderate, partial filling of osteocytes lacunae, less inflammatory infiltrate in the early periods and higher collagen deposition than the control group. **Conclusion:** The allograft bone processed by deep-freezing associated with LLLT is suitable as an alternative for the treatment of bone defects. The processing of bone grafts by deep-freezing method maintains the structural and osteoconduction characteristics of bone tissue.

Descriptors²: Allograft. Allogeneic Transplantation. Homograft. Low-Level Laser Therapy. Cryopreservation.

² Medical Subject Headings (MeSH), disponível em <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>



Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Infiltração anestésica na região frontoparietal.....	57
Figura 2 - Incisão sobre a sutura sagital e centro do frontal.....	58
Figura 3 - Dissecção dos tecidos moles com descolador freer.....	59
Figura 4 - Osteotomia para a retirada dos blocos da calvária.....	60
Figura 5 - Enxerto ósseo sendo retirado da calvária do coelho doador.....	61
Figura 6 - Remoção de seis blocos de osso da calvária de cada coelho doador.....	62
Figura 7 - Bloco autógeno (1) e alógeno (2) fixados com parafuso bicortical de 6 mm.....	64
Figura 8 - Dissecção realizada para a osteotomia e remoção das amostras.....	66
Figura 9 - A – Aloenxerto ósseo com 35 dias com laserterapia. B – Aloenxerto ósseo com 35 dias, grupo controle.....	72
Figura 10 - A - Aloenxerto ósseo com 70 dias com laserterapia. B - Aloenxerto ósseo com 70 dias, grupo controle.....	73
Figura 11 - A - Autoenxerto ósseo com 35 dias com laserterapia. B - Autoenxerto ósseo com 35 dias, grupo controle.....	74
Figura 12 - A - Autoenxerto ósseo com 70 dias com laserterapia. B - Autoenxerto ósseo com 70 dias, grupo controle.....	75
Figura 13 - A - Microscopia Eletrônica de varredura 45 X. B - H&E objetiva 4 X. C - Microscopia Eletrônica de varredura 500 X. Grupo de aloenxerto ósseo com 35 dias com laserterapia (L alo 35).....	78
Figura 14 - A - Microscopia Eletrônica de varredura 45 X. B - H&E objetiva 4 X. C - Microscopia Eletrônica de varredura 500 X. Grupo de aloenxerto ósseo com 35 dias Controle (C alo 35).....	79
Figura 15 - A - Microscopia Eletrônica de varredura 45 X. B - H&E objetiva 4 X. C - Microscopia Eletrônica de varredura 500 X. Grupo de aloenxerto ósseo com 70 dias com laserterapia (L alo 70).....	80
Figura 16 - A - Microscopia Eletrônica de varredura 45 X. B - H&E objetiva 4 X. C - Microscopia Eletrônica de varredura 500 X. Grupo de aloenxerto ósseo com 70 dias Controle (C alo 70).....	81
Figura 17 - A - Microscopia Eletrônica de varredura 45 X. B - H&E objetiva 4 X. C - Microscopia Eletrônica de varredura 500 X. Grupo de autoenxerto ósseo com 35 dias com laserterapia (L auto 35).....	82
Figura 18 - A - Microscopia Eletrônica de varredura 45 X. B - H&E objetiva 4 X. C - Microscopia Eletrônica de varredura 500 X. Grupo de autoenxerto ósseo com 35 dias Controle (C auto 35).....	83
Figura 19 - A - Microscopia Eletrônica de varredura 45 X. B - H&E objetiva 4 X. C - Microscopia Eletrônica de varredura 500 X. Grupo de autoenxerto ósseo com 70 dias com laserterapia (L auto 70).....	84
Figura 20 - A - Microscopia Eletrônica de varredura 45 X. B - H&E objetiva 4 X. C - Microscopia Eletrônica de varredura 500 X. Grupo de autoenxerto ósseo com 70 dias Controle (C auto 70).....	85



Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Organização dos grupos experimentais	56
Quadro 2 - Critérios semi-quantitativos utilizados para análise de microscopia óptica.	67
Quadro 3 - Grupo de aloenxerto ósseo com 35 dias grupo controle (C alo 35) e com laserterapia (L alo 35).	76
Quadro 4 - Grupo de aloenxerto ósseo com 70 dias grupo controle (C alo 70) e com laserterapia (L alo 70).	76
Quadro 5 - Grupo de autoenxerto ósseo com 35 dias grupo controle (C auto 35) e com laserterapia (L auto 35).	76
Quadro 6 - Grupo de autoenxerto ósseo com 70 dias grupo controle (C auto 70) e com laserterapia (L auto 70).	76



Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ADP	-	Adenosina difosfato
AsGaAl-		Arseneto de Gálio-Alumínio
ATP	-	Adenosina trifosfato
BMP	-	Bone Morphogenetic Protein (Proteína Óssea Morfogenética)
BMPs	-	Bone Morphogenetic Proteins (Proteínas Ósseas Morfogenéticas)
C	-	Controle
CAM	-	Concentração alveolar mínima
CEMM-		Centro de Microscopia e Microanálises
CEP	-	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	-	Comitê de Ética para o uso de Animais
cm	-	Centímetro
cm ²	-	Centímetro quadrado
CNPq	-	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
SBCAL	-	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
λ	-	Comprimento de Onda
CTBMF	-	Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilo facial
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
GaAlAs	-	Gallium-Aluminiun-Arsenide (Arseneto de Gálio-Alumínio)
°C	-	Graus celsius
GBR	-	Guided Bone Regeneration (Regeneração Óssea Guiada)
H ₂ O ₂	-	Peróxido de Hidrogênio
HA	-	Hidroxiapatita
H&E	-	Hematoxilina e Eosina
He-Ne	-	Hélio-Neônio
HIV	-	Human immunodeficiency virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
J	-	Joule
J/cm ²	-	Joule por centímetro quadrado
Kg	-	Quilograma
L	-	Laser

L/min	-	Litros por minuto
LASER-		Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Amplificação da Luz pela Emissão Estimulada de Radiação)
LLLT	-	Low-Level Laser Therapy (laserterapia de baixa potência)
Ltda	-	Limitada
MDGF-		Macrophage-Derived Growth Factor (Fator de Crescimento Derivados de Macrófagos)
<	-	Menor que
MEV	-	Microscopia Eletrônica de Varredura (Scanning Electron Microscopy)
MO	-	Microscopia Óptica
mg	-	Miligrama
ml	-	Mililitro
mm	-	Milímetro
mW	-	MiliWatt
n	-	Número
nº	-	Número
N	-	Newton
nm	-	Nanômetro
<i>p – value</i>	-	p - valor
PRP	-	Plasma Rico em Plaquetas
PDGF	-	Platelet Derived Growth Factor (Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas)
PUCRS-		Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
%	-	Porcentagem
pH	-	Potencial Hidrogeniônico
®	-	Registrado
RPM	-	Rotações por Minuto
SEM	-	Scanning Electron Microscopy (Microscopia Eletrônica de Varredura)
SP	-	São Paulo

TGF- β - Transforming Growth Factor Beta (Fator de Crescimento de Transformação Beta)

UDESC- Universidade do Estado de Santa Catarina

UNIPLAC- Universidade do Planalto Catarinense

X - Vezes



Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISTA DA LITERATURA.....	27
2.1	AUTOENXERTO E ALOENXERTO ÓSSEO	27
2.2	PROCESSAMENTO DO ALOENXERTO ÓSSEO.....	29
2.3	O PROCESSO DE INCORPORAÇÃO DOS ENXERTOS ÓSSEOS.....	31
2.4	ENXERTO ÓSSEO ALÓGENO EM BLOCO PARA A RECONSTRUÇÃO DO REBORDO ALVEOLAR	34
2.5	EFEITOS DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA NA OSTEOGÊNESE	36
2.6	ESTUDOS SOBRE LASERTERAPIA NA REGENERAÇÃO ÓSSEA	41
3	OBJETIVOS	52
3.1	OBJETIVO GERAL	52
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
4	METODOLOGIA	54
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	54
4.2	CARACTERIZAÇÃO	54
4.3	MODELO ANIMAL E ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	54
4.3.1	Coelhos doadores dos blocos ósseos	55
4.3.2	Coelhos receptores dos blocos ósseos	55
4.4	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO NOS ANIMAIS DOADORES	56
4.5	PROCESSAMENTO POR CONGELAMENTO PROFUNDO DOS BLOCOS DE ENXERTOS ÓSSEOS	62
4.6	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO NOS ANIMAIS RECEPTORES.....	63
4.7	PROTOCOLO DE LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA.....	65
4.8	PROTOCOLO PARA A MORTE DOS ANIMAIS E REMOÇÃO DAS AMOSTRAS.....	65
4.9	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	66
4.10	ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR MO E MEV	67
5	RESULTADOS.....	71
5.1	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DESCRITIVA E SEMI-QUANTITATIVA POR MICROSCOPIA ÓPTICA	71
5.2	AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DOS ENXERTOS NA INTERFACE ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E MICROSCOPIA ÓPTICA (MO).....	77
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICE A.....	107
	APÊNDICE B.....	115
	ANEXO A	122
	ANEXO B	123
	ANEXO C	124



Introdução

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais objetivos da Odontologia é a restauração do sistema estomatognático restabelecendo a forma, a função, a estética, a fonação, a auto-estima dos indivíduos que sofreram perdas teciduais devido a traumatismos, patologias, atrofias, cirurgias e defeitos congênitos.

Quando ocorre uma fratura, se instala um implante osseointegrado ou se realiza um enxerto para aumentar o substrato ósseo antes da inserção de implantes, o que se pretende é a reparação óssea completa, ou seja, a formação de novo osso que, através de um processo de remodelação, seja idêntico ao pré-existente (HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006).

Existem limites para a capacidade de reparação óssea, e a completa recuperação pode não ocorrer se houver deficiência de suprimento sanguíneo, instabilidade mecânica, ou competição com tecidos altamente proliferativos (PINHEIRO e GERBI, 2006).

A extensão e a velocidade da reparação, contudo, dependem da localização anatômica, do agente etiológico, da dimensão da lesão e das características biológicas de cada indivíduo. A reparação óssea é mais lenta e difere da reparação e regeneração de tecidos moles devido à morfologia e a composição (SILVA Jr. et al., 2002; PINHEIRO e GERBI, 2004).

Os defeitos ósseos podem ser muito grandes para o reparo espontâneo e fisiológico. Existem diversos métodos que podem ser usados para melhorar o reparo ósseo que incluem o uso de enxertos e posteriormente de laserterapia (WEBER et al., 2006).

A laserterapia iniciou empiricamente nos anos de 1960, e desde então ganhou credibilidade e seguidores no mundo. Nas últimas duas décadas diversos estudos foram publicados em jornais científicos, possibilitando o uso clínico baseado em evidências científicas (BRUGNERA Jr., 2009).

O osso é o mais comum tipo de enxerto utilizado em implantodontia oral, em cirurgia protética, no tratamento de defeitos congênitos e em procedimentos reconstrutivo dos maxilares (WEBER et al., 2006).

O tratamento com implantes osseointegrados é reconhecidamente um método seguro e previsível para reabilitar pacientes edêntulos. Entretanto, algumas vezes o rebordo alveolar se encontra muito reabsorvido o que impossibilita a colocação de implantes. Para compensar a perda óssea, várias técnicas para aumento de rebordo alveolar foram propostas, geralmente com

autoenxertos. Alternativamente pode-se utilizar aloenxertos. Objetivando a reconstrução óssea de rebordos alveolares com deficiência em altura e espessura, os enxertos ósseos autógenos ou alógenos, permitem uma ancoragem óssea eficiente que possibilitam a colocação dos implantes em posição e alinhamento adequados, de modo a favorecer a função e a estética final (LEVANDOWSKI Jr. et al., 2008).

Para reconstruir um defeito ósseo alveolar severo o osso autógeno é a primeira opção, por oferecer maior previsibilidade de resultado, não transmitir doenças e oferecer completa histocompatibilidade (TRUMEEES e HERCOWITZ, 1999; VACCARO, 2002; ZIPFEL et al., 2003; BOSTROM e SEIGERMAN, 2005). Mas os procedimentos de remoção do osso aumentam o tempo e o custo da cirurgia, e requerem uma segunda área cirúrgica, possibilitando dessa forma um maior desconforto pós-operatório. Outra dificuldade na obtenção do osso autógeno é a quantidade limitada obtida da região intra-oral de áreas como a tuberosidade da maxila, alvéolos de extração, regiões alveolares edêntulas, sínfise mandibular, ramo e região retromolar (SÁNCHEZ et al., 2003).

A remoção óssea de região extra-oral nem sempre é bem aceita pelo paciente, por envolver procedimentos em ambiente hospitalar, com maior custo, maior risco de infecção e sequelas pós-cirúrgicas. Por tudo isto, busca-se cada vez mais o desenvolvimento de técnicas alternativas ou de biomateriais que possam contornar estas dificuldades e diminuir a morbidade cirúrgica (KEITH Jr., 2004).

Existem diversas opções para a reposição óssea: osso autógeno ou alógeno medular ou cortical, matriz óssea desmineralizada, medula óssea autógena, substitutos de enxertos ósseos a base de sulfato de cálcio, hidroxiapatita, beta-tricálcio fosfato. Outras opções incluem as proteínas ósseas morfogenéticas recombinantes e fatores de crescimento (BAUER e MUSCHLER, 2000; FINKEMEIER, 2002).

O osso alógeno, obtido de um doador, surge como uma boa opção de enxerto, após o advento dos bancos de tecidos e a ampliação e melhora das técnicas de preservação, é maior a disponibilidade dos aloenxertos, o que vem ao encontro das necessidades da implantodontia (LEVANDOWSKI Jr. et al., 2008).

As vantagens em se utilizar osso alógeno incluem: maior disponibilidade óssea, eliminação de uma segunda região operada para remoção de osso autógeno, prevenção de

morbidade na região doadora, menor custo no tratamento, e melhor aceitação pelo paciente (KEITH Jr., 2004).

Durante os primeiros cem anos (1880-1980) de uso de aloenxertos, o maior problema encontrado era a disponibilidade, pois não havia legislação que protegesse o processamento, os doadores e receptores. Durante os outros vinte anos (1980-2000), o maior problema passou a ser a segurança. Evitar a transmissão de doenças se tornou primordial. Os testes sanguíneos mais sensíveis, e o grande esforço dos bancos de tecidos em desenvolver mecanismos de limpeza e remoção de agentes infecciosos ajudaram a proporcionar transplantes ósseos seguros. A maior preocupação agora é a eficácia dos enxertos ósseos (TOMFORD, 2000).

Na busca pela incorporação mais rápida e de melhor qualidade são estudados diversos materiais associados ao aloenxerto ósseo como: plasma rico em plaquetas (PRP) (SÁNCHEZ et al., 2003; JENSEN et al., 2005; ILGENLI et al., 2007), proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) (TOMFORD, 2000), bifosfonatos (DIRESTA et al., 2008), células tronco e terapia genética adjuvante (EHRHART et al., 2008), e técnicas de processamento como perfuração dos blocos com laser e desmineralização parcial (LEWANDROWSKI et al., 1997).

Com a constante evolução da Odontologia e do desenvolvimento tecnológico, a laserterapia vem ocupando o seu espaço em cirurgia oral e implantodontia. Quando o laser é utilizado em baixa potência visa sua ação terapêutica sobre os diferentes tecidos biológicos, através da biomodulação apresentando vantagens na reparação tecidual e no processo de remodelação óssea. Devido ao aumento da utilização de aloenxertos ósseos nas reabilitações orais e as vantagens do uso do laser, esta pesquisa tem por objetivo analisar os efeitos da laserterapia de baixa potência no processo de incorporação óssea de aloenxertos em bloco processados por congelamento profundo implantados em calvárias de coelhos.



Revista da Literatura

2 REVISTA DA LITERATURA

2.1 AUTOENXERTO E ALOENXERTO ÓSSEO

A cirurgia de enxertos ósseos tem uma longa e controversa história, sendo que a primeira descrição clara ocorreu em 1682, quando Jobi Meekren realizou um xenoenxerto em um defeito no crânio de um soldado com um fragmento do crânio de um cão. Houve outros trabalhos publicados em 1908 por Lexer com o uso de aloenxertos, e em especial o artigo de Urist de 1953 que contém as bases fisiológicas das cirurgias de enxertos ósseos, onde foram revisadas as evidências experimentais de diversos mecanismos que influenciam o sucesso e as falhas de autoenxertos, aloenxertos e xenoenxertos (BRAND, 2008).

O tratamento experimental de deformidades maxilofaciais e craniofaciais com vários tipos de enxertos passaram por diversos aprimoramentos. O enxerto ósseo ideal deveria ser osteoindutivo, para estimular a osteogênese, e osteocondutivo para prover um arcabouço que estabeleça ótimas condições para o crescimento de vasos sanguíneos e células com potencial osteogênico. Estes requisitos são adequadamente encontrados nos autoenxertos ósseos. Contudo, a morbidade do sitio doador e o volume limitado, tem estimulado a pesquisa por materiais substitutos ao osso autógeno (FINKEMEIER, 2002; PRIPATNANONT et al., 2007).

O osso é o segundo tecido mais transplantado do mundo sendo superado pelo transplante sanguíneo. São mais de 2,2 milhões de enxertos ósseos realizados no mundo e 450.000 nos Estados Unidos por ano. O osso autógeno tem sido o implante de escolha para a maioria destes procedimentos. Nos Estados Unidos, o osso autógeno foi utilizado em aproximadamente 60% dos enxertos ósseos em 1996, comparado com 34% de aloenxertos e 7% de outros materiais (BETZ, 2002).

O autoenxerto é o padrão ouro de enxerto ósseo devido a sua inerente osteogenicidade, osteocondutividade e osteoindutividade. Ele carrega um complemento de células, principalmente os osteoblastos, que são capazes de assegurar rápida incorporação do enxerto no sitio de implantação (GALEA e KEARNEY, 2005). O aloenxerto ósseo é a próxima melhor alternativa, embora a rejeição imunogênica pequena e a transmissão de doenças são questões não resolvidas.

Os materiais de enxertos sintéticos eliminam estes riscos, mas não transferem osteoindução ou elementos osteogênicos ao sítio hospedeiro (BETZ, 2002).

Um aloenxerto, por definição, é algum tecido coletado de um indivíduo e implantado em outro da mesma espécie. Formas estruturais e fragmentadas são disponibilizadas e preparadas através de congelamento ou liofilização. Este enxerto permite uma armação estrutural ou arcabouço para o tecido do hospedeiro crescer, e conseqüentemente fazendo um aloenxerto osteocondutivo (BOSTROM e SEIGERMAN, 2005).

Segundo a American Academy of Orthopaedic Surgeons as vantagens do aloenxerto ósseo proveniente de cadáver é que o osso está disponível de várias formas e tamanhos, evitando a necessidade de sacrificar estruturas do hospedeiro e a morbidade do sítio doador (GREENWALD et al., 2001).

Se aloenxertos frescos contendo células osteogênicas são implantados, o hospedeiro responde com rejeição aguda ao aloenxerto e contra o componente celular, resultando em sua destruição e potencial para danos colaterais para a matriz (GALEA e KEARNEY, 2005).

As propriedades osteoindutivas dos aloenxertos são ínfimas. Existe a expectativa após a implantação de uma resposta imune do hospedeiro. O congelamento ou liofilização do aloenxerto é crucial para minimizar esta reação, mesmo que propriedades fundamentais do material possam ser alteradas. Embora o risco de transmissão de doenças durante a implantação de aloenxertos seja raro, ela existe e não é inconseqüente. De acordo com a Associação Americana de Bancos de Tecidos, não houve casos de transmissão de HIV relatados em mais de dois milhões de casos usando aloenxerto ósseo em cinco anos (BOSTROM e SEIGERMAN, 2005).

A osteoindução é a habilidade do enxerto para induzir células tronco não diferenciadas ou células osteoprogenitoras para se diferenciarem em osteoblastos. Esta propriedade tem sido atribuída às proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), a maioria citoquinas da superfamília TGF- β , que estão associadas com o colágeno componente do osso (GALEA e KEARNEY, 2005).

Para ser considerado como osteocondutivo, um material deve servir como um suporte estrutural para as células do hospedeiro onde elas podem migrar completamente, aderir e se diferenciar em células osteogênicas. Nova formação óssea intimamente no arcabouço é o resultado final mais apropriado do que uma cicatriz tecidual fibrosa (DELLOYE et al., 2003).

Quando comparamos o autoenxerto e o aloenxerto ósseo observamos as propriedades dos enxertos e as vantagens e desvantagens. Propriedades dos autoenxertos: são osteogênicos,

osteointutivo e osteocondutivos. Propriedades dos aloenxertos: são osteocondutivos e fracamente osteointutivo. Vantagens dos autoenxertos: não há rejeição do hospedeiro, não há transmissão de doenças, retêm osteoblastos viáveis. Vantagens dos aloenxertos: maior disponibilidade óssea através dos bancos de ossos e tecidos, disponibilidade de formas customizadas, não é necessário procedimento cirúrgico adicional. Desvantagens dos autoenxertos: morbidade, disponibilidade limitada. Desvantagens do aloenxerto: imunogênico, risco de transmissão de doenças, não osteogênico, resultados clínicos variáveis (BETZ, 2002; HAAS et al., 2002; LONG Jr. et al., 2007; INODA et al., 2007; LEVANDOWSKI Jr. et al., 2008).

2.2 PROCESSAMENTO DO ALOENXERTO ÓSSEO

O processamento de osso alógeno visando à segurança pode levar a associação de problemas em suas propriedades mecânicas, osteocondução e osteointuição. Osteointuição e resistência são propriedades críticas nos aloenxertos ósseos. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um oxidante químico com o potencial de comprometer a osteointutividade e proteínas ósseas estruturais (DEPAULA et al., 2005).

O risco infeccioso para o receptor pode ser diminuído por meio de testes sorológicos dos doadores, descarte de material que produza cultura bacteriológica positiva, manipulação do enxerto sob condições assépticas e esterilização, seja por radiação ou óxido de etileno (BAPTISTA et al., 2003).

A base para o processo de conservação é a redução da água livre a níveis críticos. O congelamento profundo pode ser utilizado para imobilizar a água livre (GALEA e KEARNEY, 2005).

O congelamento causa expansão nas áreas ocupadas pelas células e seus núcleos. A água contida no citosol e núcleo experimentam uma dilatação térmica com a redução da temperatura que resulta na expansão e ruptura das membranas celular e nuclear. A necrose dos osteócitos, resultante da dilatação da água durante o congelamento, não deve ser entendida como um fenômeno indesejado, pois a principal função do osso cortical é prover um arcabouço para a formação de novo osso e, além de assegurar a resistência mecânica ao enxerto (ANDRADE et al. 2008).

Aloenxertos ósseos podem ser obtidos de humanos vivos e cadáveres e são processados através de congelamento, liofilização, autoclavagem, desproteinização e descalcificação. O decréscimo da antigenicidade do enxerto através do congelamento ou remoção de sangue e conteúdo celular influencia no sucesso. Aloenxertos ósseos, liofilizados, desmineralizados, e congelados podem ser utilizados para reconstrução de defeitos ósseos em cirurgia oral e maxilofacial (ASLAN et al., 2006).

Técnicas de esterilização como a exposição à irradiação gama e óxido de etileno diminui significativamente o risco de transmissão de infecções, mas subsequentemente diminui as propriedades osteoindutivas do enxerto (BOSTROM e SEIGERMAN, 2005). Devido à perda de resistência mecânica o osso liofilizado e irradiado está indicado somente para o preenchimento de cavidades na forma triturada (DELLOYE et al., 2003).

As células mesenquimais osteoprogenitoras possuem afinidade de ligação com o osso alógeno, mas os procedimentos de desinfecção e esterilização do osso alógeno influenciam tanto positivamente quanto negativamente os processos de adesão, proliferação e diferenciação celular (HOFMANN et al., 2005).

Pode-se afirmar que a temperatura de -70°C é mais efetiva do que a temperatura de -20°C na necrose de células ósseas. Embora num longo tempo de congelamento a -20°C podem ocorrer resultados similares, porém pode não ser um protocolo seguro para reduzir a imunogenicidade. A necrose tecidual neste tratamento está fortemente associada à formação de gelo dentro das células e matriz extracelular. A criopreservação com congelamento profundo (-70°C) reduz substancialmente o potencial antigênico do tecido ósseo (ANDRADE et al., 2008).

O potencial imunogênico altera-se conforme o preparo recebido pelos enxertos. Os enxertos frescos causam reações imunes inaceitáveis à sua aplicação clínica. O congelamento destes diminui de forma considerável esta resposta imune do hospedeiro, preservando as propriedades biomecânicas e osteoindutivas do enxerto. A associação de congelamento e desidratação, como na liofilização, diminui ainda mais a resposta imune, porém à custa de alterações biomecânicas indesejáveis (BAPTISTA et al., 2003). Portanto quanto mais agressivo o processamento menos frequente e menor é a intensidade da resposta imunológica (BETZ, 2002).

O conteúdo colágeno do osso alógeno é mantido intacto durante o congelamento a -85°C e é tido como uma rica fonte de fatores de crescimento e proteínas óssea morfogenéticas (BMPs) assim como a matriz do leito receptor ósseo sadio (BAPTISTA et al., 2003).

A validade de estocagem do osso fresco congelado a temperatura de -20°C é de um ano e a temperatura de -70°C é de cinco anos. A validade do osso liofilizado é indefinida (BETZ, 2002).

Modelos animais têm demonstrado que a persistência de células aprisionadas nas lacunas dos osteócitos de aloenxertos ósseos congelados podem ainda sensibilizar um hospedeiro. A maioria dos estudos em humanos que comparam os resultados clínicos e histológicos com antígeno de leucócito humano tipificado não demonstrou uma reação imune importante clinicamente relacionada ao uso de aloenxertos ósseos congelados em humanos (BAUER, 2007).

2.3 O PROCESSO DE INCORPORAÇÃO DOS ENXERTOS ÓSSEOS

A incorporação pode ser definida como o processo de união do material enxertado com o tecido receptor. A incorporação de um enxerto ósseo apresenta uma cascata de eventos similares às fases de consolidação de uma fratura (TRUMEES e HERCOWITZ, 1999; ZIPFEL et al., 2003). Independente do tipo de enxerto ósseo ocorre diferentes fases até a sua incorporação final, que são didaticamente divididas em inflamação, revascularização, osseoindução, osseocondução, e remodelação (GOLDBERG e STEVENSON, 1987).

O tecido do aloenxerto ósseo é necrótico, e a incorporação com o osso adjacente ocorre pelo reconhecimento morfológico e pela identificação de espículas de osso necrótico (sem células nas lacunas de osteócitos). Este processo denominado “*creeping substitution*” mimetiza o caminho em que o osso necrótico é reabsorvido e neoformado após a fratura óssea (BAUER, 2007).

Ocorre um processo inflamatório inicial e um aumento da atividade vascular na região receptora imediatamente após a colocação do enxerto (BURCHARDT et al., 1978; BAPTISTA et al., 2003; GALEA e KEARNEY, 2005; KAHNBERG, 2006), mediados por fatores de crescimento e indutores, principalmente o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento de transformação β (TGF- β) (BAPTISTA et al., 2003; PONTUAL e MAGINI, 2004; PINHEIRO e GERBI, 2006). O papel das plaquetas como a maior fonte de PDGF ressalta a importância do coágulo sanguíneo na regeneração óssea (TRUMEES e HERCOWITZ, 1999; BAPTISTA et al., 2003; ZIPFEL et al., 2003).

Um fator primordial é o íntimo contato do enxerto com o tecido vascularizado do hospedeiro para determinar a incorporação (GALEA e KEARNEY, 2005). Os espaços entre os fragmentos inibem a passagem dos sinais moleculares e a criação de uma estrutura osteocondutiva (TRUMEES e HERCOWITZ, 1999). A estabilidade do enxerto também é essencial, pois a revascularização não irá ocorrer em uma superfície instável, e a atividade dos osteoblastos só ocorre quando adjacentes a vasos sanguíneos (DELLOYE et al., 2003; ARROTEIA e PEREIRA, 2005).

No interior do enxerto autógeno, as células que não foram mantidas pela difusão de nutrientes através de adequada revascularização, apresentam necrose (GALEA e KEARNEY, 2005). O trauma cirúrgico e a descorticalização também leva à necrose do osso enxertado. Com a morte celular, há liberação dos produtos intracelulares. Estes produtos, aliados a uma baixa tensão do oxigênio e do pH, servem como quimiotáticos para células osteoprogenitoras indiferenciadas da área receptora (TRUMEES e HERCOWITZ, 1999; ZIPFEL et al., 2003; GALEA e KEARNEY, 2005). Por volta do quinto dia ocorre atração dos macrófagos, por quimiotaxia, para a área enxertada. A partir daí, os processos reparativos serão estimulados pelos fatores de crescimento derivados dos macrófagos (MDGF) (PONTUAL e MAGINI, 2004; PINHEIRO e GERBI, 2006).

As células e os tecidos necrosados são removidos pelos macrófagos. Isto cria espaços e canais para a proliferação dos vasos sanguíneos do tecido circundante. São estes vasos que darão suporte aos elementos celulares adicionais (osteoblastos e osteoclastos). Os osteoclastos dissolvem o osso desvitalizado e os osteoblastos formam o novo osso (GALEA e KEARNEY, 2005). O interior do osso cortical não é penetrado por vasos sanguíneos antes de uma semana. A velocidade com que o enxerto será revascularizado dependerá do fato de ser medular ou cortical. A arquitetura porosa do osso medular permite uma revascularização mais rápida e completa do tecido em relação ao que normalmente é visto no osso cortical, levando cerca de duas semanas. No osso cortical, diferente do osso medular, o reparo é iniciado por osteoclastos, e somente após quatro semanas os osteoblastos aparecem para preencher os espaços (BURCHARDT et al., 1978).

Após a revascularização do enxerto e reparo quase completo da área, que ocorre por volta da 4ª semana, os macrófagos dão lugar aos osteoblastos (PONTUAL e MAGINI, 2004), numa cascata mediada por outros fatores químicos (TRUMEES e HERCOWITZ, 1999; ZIPFEL et al.,

2003). Ocorre a liberação das proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), que agem nas células adjacentes do canal medular e nos pré-osteoblastos, e induzem a proliferação e diferenciação destas células em osteoblastos funcionais, que irão secretar matriz óssea (TRUMEEES e HERCOWITZ, 1999; PONTUAL e MAGINI, 2004).

Teremos no mesmo enxerto uma mistura de osso viável e sem vitalidade, que será gradualmente substituído por novo osso a partir da segunda semana até os seis meses. Áreas de novo osso e osso não vital podem coexistir por anos. Uma formação óssea significativa normalmente ocorre após 12 semanas, e coincide com a fase de consolidação da união enxerto-hospedeiro (BURCHARDT et al., 1978; BAUER e MUSCHLER, 2000).

A partir deste momento o enxerto progride para um osso maduro e funcional, através de um ciclo normal de reabsorção e aposição óssea (TRUMEEES e HERCOWITZ, 1999; PONTUAL e MAGINI, 2004).

Hipoteticamente estes mesmos processos ocorrem com o osso alógeno, na interface de união enxerto-hospedeiro, porém de forma mais lenta, devido à maior reação inflamatória inicial, menor revascularização (BURCHARDT et al., 1978; NATHER, 2003; ZIPFEL et al., 2003) e ao fato do osso alógeno não participar da fase inicial da incorporação, por não possuir função osteogênica, depende totalmente da área receptora para fornecer os elementos vitais para esta fase (ALLARD et al., 1987). O osso alógeno parece agir mais como uma matriz mineral, que fornece suporte para a migração e proliferação celular (GALEA e KEARNEY, 2005).

Pequenas quantidades de osso alógeno tendem a ser completamente remodeladas em humanos. Grandes aloenxertos, como os utilizados na ortopedia, têm incorporação limitada à formação óssea superficial (BAUER e MUSCHLER, 2000; NATHER, 2003). A remodelação geralmente está restrita a apenas dois a seis milímetros na interface enxerto-hospedeiro provavelmente devido ao aloenxerto ósseo cortical processado por congelamento profundo não apresentar características de osteogênese ou osteoindução. Sua principal característica é a osteocondução propiciando um arcabouço para as células do hospedeiro repopularizar sua estrutura física (NATHER, 2003).

Enxertos ósseos alógenos ou autógenos induzem vascularização, e mobilização de células osteoprogenitoras provenientes do tecido mesenquimal do hospedeiro e rapidamente convertem estas em tecido ósseo (MALININ e TEMPLE, 2007). Se os fatores de crescimento não fossem

ativados, um aloenxerto ósseo não teria vantagem biológica sobre um substituto ósseo sintético (ASPENBERG, 1996).

Com o aloenxerto a formação de novo osso ocorre primeiramente abaixo do perióstio e na interface entre o enxerto e o hospedeiro (BAUER, 2007).

Segundo Bauer (2007) os enxertos ósseos e os materiais substitutos de enxertos deveriam ser avaliados através da histologia para definir a biocompatibilidade e as propriedades bioativas.

2.4 ENXERTO ÓSSEO ALÓGENO EM BLOCO PARA A RECONSTRUÇÃO DO REBORDO ALVEOLAR

Uma das áreas clínicas que frequentemente requerem procedimentos de enxertos ósseos é a implantodontia, onde a perda de volume ósseo muitas vezes impede a colocação adequada de implantes na região do rebordo alveolar (BELOTI et al., 2008).

Com a popularização dos implantes dentários aumentou a possibilidade de tratamento para áreas edêntulas. Houve também um aumento na busca da excelência estética por parte dos profissionais devido à maior exigência dos pacientes. Em grandes perdas ósseas nos rebordos alveolares ocasionadas por traumatismos, patologias, cirurgias, perdas dentárias, a alternativa terapêutica de colocação de implantes necessita geralmente de enxertos ósseos procurando restabelecer a função, a forma e a estética (ARX et al., 2001; FEUILLE et al., 2003; HOEXTER, 2003; KAUFMAN e WANG, 2003; CHIAPASCO et al., 2006).

O planejamento reverso é a base do tratamento atual com implantes dentários, em que o posicionamento ideal da coroa protética visando a melhor função e estética é que vai determinar o posicionamento do implante (LEVANDOWSKI Jr. et al., 2008). Em virtude deste planejamento, áreas onde seriam instalados implantes de pequeno diâmetro e inclinados, numa posição desfavorável comprometendo a prótese e a estética, se fazem necessário a colocação de blocos de enxertos ósseos aposicionais para posteriormente instalar os implantes na posição ideal (KEITH Jr., 2004; ZADEH, 2004; CHIAPASCO et al., 2006; KEITH Jr. et al., 2006; WALLACE e GELLIN, 2010). A partir da década de 90 do século XX, os implantes de titânio e próteses sobre implantes começaram a ser relacionados com os aloenxerto em bloco (PERROT et al., 1992; KONDELL et al., 1996; WILLIAMSON, 1996; ACCETURI et al., 2000; LEONETTI e KOUP, 2003; LYFORD et al., 2003; KEITH Jr., 2004; PETRUNGARO e AMAR, 2005).

No estudo de Keith Jr. et al. (2006), com abrangência de 73 pacientes e 82 reconstruções alveolares, constatou-se o sucesso de 93% dos blocos em 12 meses, e 99% dos implantes, em um período de 25 a 36 meses após a colocação de carga. Apesar do maior potencial imunogênico do osso alógeno o pós-operatório dos pacientes foi menos traumático em relação à enxertia autógena, e os casos que apresentaram falhas pareciam estar relacionados com erro de técnica ou infecção bacteriana e não por reação imunológica. Não houve grandes diferenças clínicas ou radiográficas em relação à enxertia autógena.

As biópsias realizadas no momento da colocação dos implantes em diversos estudos (KONDELL et al., 1996; LEONETTI e KOUP, 2003; PETRUNGARO e AMAR, 2005; KEITH Jr. et al., 2006) evidenciaram no exame histológico a deposição de novo osso e até mesmo ausência de resíduos do material enxertado. Não foi relatada reação imunológica indesejável em nenhum caso. Os aloanticorpos pesquisados não foram detectados no sangue periférico, o que parece demonstrar que o osso alógeno e implantes de titânio podem ser usados na reconstrução de maxilas extremamente reabsorvidas (KONDELL et al., 1996).

Acredita-se que o volume do enxerto e a sua colocação no leito receptor têm profundo impacto na quantidade e na qualidade da incorporação óssea, pois grandes volumes demoram mais para incorporar ou não são totalmente incorporados (TRUMEEES e HERCOWITZ, 1999; BAUER e MUSCHLER, 2000; NATHER, 2003).

O osso autógeno cortical é densamente mineralizado, pouco vascularizado e possui pequena quantidade celular (ARROTÉIA e PEREIRA, 2005). O autoenxerto cortical não vascularizado possui a vantagem de fornecer suporte mecânico na área enxertada. O uso do osso autógeno também elimina o risco de reações imunológicas, mas de uma maneira geral, em pequenas reconstruções, oferece pouca vantagem em relação ao osso cortical alógeno, particularmente quando a morbidade é considerada (BAUER e MUSCHLER, 2000). As principais áreas doadoras da região intra-oral (mento e ramo de mandíbula) são predominantemente formadas por osso cortical (KAHNBERG, 2006). Alguns autores, como Bauer e Muschler (2000) e Vaccaro (2002) salientam que mesmo no osso autógeno, a maioria das células viáveis da região doadora necrosa ao serem separadas do suprimento sanguíneo e processadas no leito cirúrgico.

Os aloenxertos corticais são osteocondutivos e proporcionam imediato suporte estrutural. Os aloenxertos preservados com congelamento profundo mantêm suas propriedades materiais e

podem ser implantados imediatamente após o descongelamento, enquanto os aloenxertos liofilizados podem ser friáveis e fragilizar na torção e dobramento, e devem sempre ser reidratados antes da implantação (FINKEMEIER, 2002).

Nos enxertos ósseos para aumento de rebordo alveolar na implantodontia, utiliza-se mais comumente o osso cortical, pois além da disponibilidade intra-oral, também provê maior estabilidade e resistência mecânica inicial (KAHNBERG, 2006). A parte cortical também deve ser a escolha ao se utilizar material alógeno, pois ao utilizar apenas o osso cortical minimiza-se o potencial imunogênico em relação ao osso alógeno medular, rico em células e material orgânico, e, portanto com maior potencial imunogênico (LEWANDROWSKI et al., 2001).

O maior número de artigos acerca do uso do osso alógeno na Odontologia está relacionado ao osso liofilizado particulado. O osso alógeno para enxertos em bloco é utilizado pelo menos desde os anos 60 para correção de deformidades maxilofaciais, com resultados bastante semelhantes à enxertia autógena, entretanto com reabsorção e incorporação mais lentas. Os implantes de titânio e próteses sobre implantes começaram a ser relacionados com os enxertos alógenos em bloco no final do século XX. Os casos relatados nos artigos da revisão de literatura de Levandowski Jr. et al. (2008) mostraram que os enxertos ósseos apresentavam consistência firme, bem incorporados e bem vascularizados no momento da colocação dos implantes, o que permitiu a reabilitação protética sobre os implantes em todos os pacientes.

2.5 EFEITOS DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA NA OSTEOGÊNESE

A cicatrização tecidual é um processo complexo que envolve respostas locais e sistêmicas. O processo de cicatrização de feridas envolve diversos tipos de células, enzimas, fatores de crescimento e outras substâncias. O uso de laserterapia de baixa potência para a cicatrização de feridas tem demonstrado ser efetiva na modulação das respostas locais e sistêmicas (SILVA Jr. 2002).

A laserterapia é uma modalidade de tratamento clínico que resulta em efeitos não térmicos sobre os tecidos e cujos efeitos biológicos promovem um leve aumento na temperatura (não maior que 1°C). A magnitude deste efeito depende do status fisiológico das células e/ou do estágio clínico prévio a irradiação (BRUGNERA Jr., 2009).

Com as características peculiares como coerência, monocromaticidade e unidirecionalidade, o LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) se diferencia totalmente da luz natural. Dessa maneira, ocorre o desenvolvimento de basicamente dois grupos de lasers: os lasers de alta potência de energia e os lasers de baixa potência de energia, também denominados lasers terapêuticos. A laserterapia auxilia o organismo a regular seus processos biológicos colaborando com a regeneração, restabelecendo o equilíbrio, chegando então, à cura de uma forma mais ordenada e, na maioria das vezes, mais rápida. Os efeitos biológicos observados e hoje comprovados pela estimulação com laser incluem ativação na produção de ATPs, auxílio na multiplicação de fibras colágenas, formação de enzimas específicas, auxílio ao sistema linfático, benefícios no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (microcirculação), aumento significativo na síntese de proteínas e DNA (BRUGNERA Jr. et al., 2003; PINHEIRO e GERBI, 2006).

Karu (1987) e Karu et al. (2001) afirmaram que o laser terapêutico de baixa potência constitui-se em uma terapia não-térmica, capaz de promover alterações teciduais e celulares ocasionadas por diferentes tipos de ativações metabólicas, como por exemplo: aumento da atividade nas mitocôndrias e na bomba sódio-potássio, aumento da vascularização e na formação de fibroblastos, resultando em um incremento no processo de recuperação e/ou cicatrização tecidual com características não-invasivas. A energia dos fótons absorvidos não é transformada em calor, mas, sim, em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos nas células e nos tecidos irradiados (AQUINO e GROSSI, 2005).

A resposta fotobiológica pode ser devido à absorção de um comprimento específico de onda de algum fotoreceptor molecular desconhecido que participam em reações metabólicas nas células (PINHEIRO e GERBI, 2006).

A célula tem um limiar de sobrevivência, segundo o tecido onde está localizada e segundo seu estado fisiológico. Quando se trabalha respeitando este limiar oferecendo uma baixa potência de energia, estimulamos a membrana celular e suas mitocôndrias, com o laser, se estará induzindo essa célula à biomodulação, ou seja, trabalhará buscando um estado de normalização da região afetada, denominado laserterapia (LOPES, 1999).

O efeito da laserterapia de baixa potência como adjuvante na cicatrização de feridas está comprovado em numerosos estudos clínicos e experimentais. Recentemente o foco de interesse

tem se voltado para a influência da laserterapia na cicatrização dos tecidos duros, em especial com o aumento da reparação óssea (JAKSE et al., 2007).

O laser de baixa potência produz uma radiação que é absorvida pelos tecidos, provocando efeitos diretos (bioquímicos, bioelétricos, bioenergéticos) e efeitos indiretos (estímulo de microcirculação, trofismo celular, efeitos analgésico e antiinflamatório) que estimulam a osteogênese (CARVALHO et al., 2002).

Na fase proliferativa do reparo ósseo, que ocorre nos primeiros dias, o osteoblasto está em intensa atividade de síntese, apresentando formato cubóide com prolongamentos celulares, citoplasma basófilo, núcleo excêntrico e nucléolo proeminente (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). A ultra-estrutura de um osteoblasto é compatível com a de uma célula que sintetiza proteínas, apresentando abundante retículo endoplasmático rugoso e muitas lamelas do complexo de golgi, relacionadas com a síntese e o processamento dos componentes da matriz óssea. Também estão presentes numerosas mitocôndrias, vesículas do sistema endossômico-lisossômico e grande quantidade de vesículas de secreção contendo, sobretudo colágeno tipo I (ARROTÉIA e PEREIRA, 2005; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

A importância do uso da laserterapia nesta fase proliferativa é devido ao fato que mudanças mitocondriais têm sido sugeridas como a essência responsável pelos resultados positivos da laserterapia, aumentando a proliferação celular através de mudanças fotoquímicas na mitocôndria, e a energia essencial provavelmente sendo absorvida pelos cromóforos intracelulares e convertida em energia metabólica, a maioria provavelmente envolvendo a cadeia respiratória (citocromo-c oxidase) (KARU, 1987; DORTBUDAK et al., 2000; KARU et al., 2001; DORTBUDAK et al., 2002; NICOLAU et al., 2003; STEIN et al., 2005; PINHEIRO e GERBI, 2006).

A laserfotobiomodulação é pouco detectável a partir de 30 dias após o tratamento, devido ao fato que durante os estágios iniciais da reparação óssea o componente celular é mais proeminente e mais propenso a ser afetado pela luz laser. Mais tarde a matriz óssea é o principal componente da reparação óssea. Este é o motivo pelo qual a frequência de aplicação do laser é efetiva quando conduzida durante a fase celular, em que o número de osteoblastos está aumentando (PINHEIRO e GERBI, 2006; PINHEIRO et al., 2009). Os estudos *in vitro* de células de calvária em camundongos demonstraram que eles não manifestam estímulo para a radiação a laser após 14 dias devido aos osteoblastos estarem maduros (MERLI et al. 2005).

Os estudos de Pinheiro e Gerbi (2006) refletem a idéia de que células mesenquimais indiferenciadas podem ser biomoduladas positivamente para osteoblastos, que poderia mais rapidamente se transformar em osteócitos. De outro modo a laserterapia parece ineficaz quando usada no tecido normal. Os efeitos da biomodulação da laserterapia observados demandam algum nível de deficiência tecidual.

A compreensão dos fenômenos que envolvem a interação entre os diversos lasers e tecidos baseia-se principalmente no entendimento das reações que podem ser induzidas nesses tecidos. Dentre os aspectos físicos a serem considerados está o comprimento de onda (λ). É importante lembrar que cada tipo de meio ativo resulta na produção de um raio laser com comprimento de onda específico, e que cada comprimento de onda reage de maneira diferente com cada tecido. Outro fator que deve ser considerado é a densidade de potência, que regula a quantidade de energia entregue aos tecidos. Além desses fatores físicos, temos também que considerar alguns fatores temporais, como por exemplo, a forma de emissão da luz; se esta é de forma contínua e pulsátil ou desencadeada; a taxa e a duração da pulsação. Deve-se ainda considerar se são utilizadas fibras de contato ou não, ou se o raio é focado ou desfocado (PINHEIRO E GERBI, 2004; PINHEIRO e GERBI, 2006; PINHEIRO et al., 2009).

A laserterapia com comprimento de onda no espectro infravermelho mostrou-se como um estimulante na proliferação osteoblástica, na deposição de colágeno e na neoformação óssea, desde que, aplicados nos momentos iniciais da reparação óssea, com predominância da fase proliferativa celular. As respostas vasculares à laserterapia têm sido sugeridas como possíveis mecanismos responsáveis pelos resultados clínicos positivos observados. Permanece incerto o mecanismo pelo qual se desenvolve a estimulação óssea, sugerindo ser um efeito sistêmico ou uma estimulação isolada dos osteoblastos (PINHEIRO e GERBI, 2006). É provável que a regeneração óssea seja dependente não apenas da dose de energia total da radiação laser, mas também do tempo e da forma de radiação (SAITO e SHIMIZU, 1999; PINHEIRO e GERBI, 2006).

O uso do diodo de laser de arseneto de gálio-alumínio teve um crescimento nos últimos anos. Este tipo de laser é conhecido por ter uma grande profundidade de penetração em comparação com outros tipos, e isto oferece aos clínicos uma ferramenta de penetração nos tecidos de grande eficiência. Foi relatado que a alta penetração observada em 820-840 nm poderia ser devido à baixa absorção da água neste comprimento de onda (KHADRA et al., 2004).

Os parâmetros limiaries de energia, densidade e intensidade, são biologicamente independentes uma das outras. Esta independência conta para o sucesso ou falha da laserfotobiomodulação conseguido pelos baixos níveis de densidade de energia (PINHEIRO e GERBI, 2006; PINHEIRO et al., 2009).

Foi observado que os efeitos da laserfototerapia são dose dependente. A dose de irradiação ou densidade de energia é um dos mais importantes parâmetros em laserterapia. A dose correta da irradiação influencia os resultados encontrados. Se a dose for muito baixa pode não ser efetiva, assim como, uma dose extremamente alta pode, até mesmo, ter efeitos inibitórios (DÖRTBUDAK et al., 2000; BRUGNERA Jr., 2009).

Não há um consenso de como calcular a dose em laserterapia, devido à fotobiomodulação obtida não estar limitada pela área que recebe o feixe de luz, mas também ocorre nas áreas próximas a irradiação (BRUGNERA Jr., 2009).

A controvérsia observada nos resultados das pesquisas publicadas é devido a diferentes protocolos empregados, variando o comprimento de ondas, associação de comprimento de ondas, modos de emissão, e doses em diferentes modelos de células e animais (SILVA Jr. et al., 2002).

É difícil comparar os resultados de estudos envolvendo a laserterapia de baixa potência na literatura devido à grande variedade de métodos utilizados. Poucos estudos têm utilizado métodos quantitativos para analisar o efeito da laserterapia no tecido ósseo (NICOLAU et al., 2003).

Obradović et al. (2009) realizaram uma revisão da literatura sobre laserterapia de baixa potência e a influência do reparo ósseo e a incorporação de biomateriais. Concluíram que ainda é difícil comparar os estudos sobre a ação da laserterapia na incorporação de biomateriais devido aos modelos experimentais e a duração dos tratamentos serem muito distintos. Embora, possa ser concluído que a laserterapia pode oferecer vantagens em termos de recuperação periodontal, funcionalidade óssea e incorporação de biomateriais. O desenvolvimento da tecnologia laser representa talvez uma das mais promissoras modalidades de tratamentos para aumentar a incorporação de biomateriais e para preparar um adequado sitio para o implante. A laserterapia de baixa potência como um fator de estimulação óssea, poderá ser usada pelos dentistas para auxiliar e melhorar a qualidade óssea quando fatores predictivos negativos de incorporação e osseointegração são identificados.

2.6 ESTUDOS SOBRE LASERTERAPIA NA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Destacamos alguns estudos sobre o efeito da laserterapia de baixa potência na regeneração óssea, usando para as pesquisas principalmente modelos animais, mas também humanos e culturas de células.

O objetivo do estudo de Dörtbudak et al. (2000) foi determinar o efeito da irradiação contínua de ondas de laser de diodo sobre os osteoblastos derivados de células mesenquimais da medula óssea de ratos. Três grupos, com 10 culturas cada, foram irradiados em três tempos (3, 5 e 7 dias) com um laser de baixa potência com um comprimento de onda de 690 nm por 60 segundos num total de 4,8 J/cm². Outros três grupos, com 10 culturas, foram usados como controle. Foi utilizado um método empregando um medicamento a base de tetraciclina fluorescente, para comparar o crescimento ósseo destes substratos de cultura aos 8, 12 e 16 dias. Como resultados obtiveram que as culturas com tratamento com laser demonstraram significativamente maior deposição de osso fluorescente.

O objetivo do estudo de Silva Jr. et al. (2002) foi avaliar morfometricamente a quantidade de novo osso formado pela irradiação com laser de AsGaAl (λ 830 nm) em feridas cirúrgicas criadas no fêmur de ratos com aproximadamente 1 cm². Foram utilizados neste estudo 40 ratos *Wistar* que foram divididos em quatro grupos com 10 animais em cada: grupo A (12 sessões, 4,8 J/cm² por sessão, dose total 57,6 J/cm², tempo de observação de 28 dias); grupo C (três sessões, 4,8 J/cm² por sessão, dose total de 14,4 J/cm², tempo de observação de 7 dias); os grupos B e D atuaram como controles não irradiados. A morfometria computadorizada demonstrou uma diferença significativa das áreas de mineralização dos grupos C e D (sete dias). Não houve diferenças entre os grupos A e B (28 dias). Concluíram que sob condições experimentais a laserterapia de baixa potência aumenta o reparo ósseo nos estágios precoces.

Dörtbudak et al. (2002) conduziram um estudo para avaliar os efeitos da irradiação de baixa energia a laser sobre os osteócitos e reabsorção óssea no sítio do implante. Foram usados cinco babuíños machos com média de 6,5 anos de idade em realizaram quatro perfurações para a instalação de implantes em cada crista ilíaca. Os sítios do lado esquerdo foram irradiados com 100 mW com laser de baixa energia (λ 690 nm) por 1 minuto (6 J/cm²) imediatamente após a perfuração e a inserção dos implantes. Os sítios do lado direito foram observados como controle. Cinco dias depois o osso foi removido em bloco e foi avaliado histomorfometricamente. A média

de osteócitos contados por unidade de área foi de 109,8 células no grupo irradiado e de 94,8 células no grupo controle. Como a contagem de células intra-individual variou substancialmente, a viabilidade dos osteócitos foi utilizada para a avaliação. Nos grupos irradiados os osteócitos viáveis foram encontrados em 41,7% das lacunas contra 34,4% nos grupos não irradiados. Esta diferença foi estatisticamente significativa. A área total de reabsorção e superfície erosionada foi de 24,6% no grupo irradiado e de 24,9% no grupo controle. Estas diferenças não tiveram significância estatística. Este estudo demonstrou que a viabilidade dos osteócitos era significativamente maior nas amostras que foram submetidas à irradiação a laser imediatamente após a perfuração e após a instalação do implante, quando comparado com os locais de controle. Isto pode ter um efeito positivo na integração de implantes. O grau de reabsorção óssea, em contraste, não foi afetado pela irradiação a laser.

Nicolau et al. (2003) estudaram a atividade de células ósseas após a laserterapia de baixa potência na área da cirurgia. Os fêmures de 48 ratos foram perfurados (1 mm de diâmetro x 2 mm de profundidade), 24 fêmures foram irradiados e 24 serviram de controle. O grupo irradiado foi tratado com laser de AsGaAl de λ 660 nm, 10 J/cm² de radiação por sessão no 2º, 4º, 6º, 8º dias após a cirurgia, com um total de 40 J/cm² de energia. Os animais foram mortos com 5, 15 e 25 dias. Foram realizadas análises histomorfométricas. Os resultados demonstraram um aumento no grau de aposição mineral e na superfície de osteoblastos nos grupos irradiados. Encontraram um aumento na superfície de osteoclastos principalmente nos cinco dias após a cirurgia nos animais irradiados. A atividade osteoclástica pode influenciar posteriormente a atividade osteoblástica e vice-versa. Os osteoblastos e osteoclastos têm uma interação hormonal. A matriz óssea libera uma proteína que estimula a formação osteoclástica, que é luz-dose dependente. Concordando com isto, os autores encontraram um aumento dos osteoclastos aos cinco e 15 dias, que explica a grande superfície de osteoclastos e superfície erosionada aos 25 dias. Isto também pode explicar os maiores níveis de reabsorção nos animais irradiados. O grande desenvolvimento de índices de reabsorção aos 25 dias está diretamente proporcional aos índices de estimulação de formação no estágio intermediário (25 dias). Os resultados com a laserterapia de baixa potência demonstraram que as atividades nas células ósseas ao redor dos locais injuriados a atividade osteoclástica aumenta. Concluíram que a laserterapia de baixa potência usada no período inflamatório do processo de reparo ósseo, aumenta a atividade celular normal (reabsorção e formação).

O estudo de Pinheiro et al. (2003) teve como objetivo avaliar histologicamente o efeito da laserterapia de baixa potência (Low-Level Laser Therapy - LLLT) (λ 830 nm) no reparo de defeitos ósseos padronizados (3 mm) no fêmur de 24 ratos *Wistar albinus* que foram submetidos a implantes com osso bovino inorgânico Gen-ox^{®3}. Três grupos aleatoriamente formados foram estudados: grupo I (controle, n=6); grupo II (Gen-ox[®], n=9); e grupo III (Gen-ox[®] + LLLT, n=9). Os animais foram irradiados a cada 48 horas durante 15 dias, sendo que a primeira irradiação foi realizada imediatamente após a cirurgia. Os animais foram irradiados transcutaneamente em quatro pontos em volta do defeito ósseo. Em cada ponto a dose de 4 J/cm² era aplicada (\varnothing ~0.6 mm, 40 mW) e a dose total por sessão era de 16 J/cm². A dose total foi de 128 J/cm². Os animais foram mortos por uma overdose de anestesia geral aos 15, 21 e 30 dias após a cirurgia. Após a análise histológica os resultados mostraram evidência de um reparo ósseo mais avançado nos espécimes irradiados em relação aos não irradiados. O reparo nos espécimes irradiados foi caracterizado por uma maior neoformação óssea, bem como por uma maior proliferação de fibras colágenas no interior do defeito já a partir de 15 dias após a cirurgia, também considerando a capacidade osteocondutiva do Gen-ox[®]. Conclui-se que a laserterapia de baixa potência resultou num efeito de biomodulação positiva sobre o reparo do defeito ósseo submetido a implante de osso bovino inorgânico.

Com o objetivo de investigar a eficiência da terapêutica da irradiação do laser (He-Ne; λ 632,8 nm) e do osso orgânico bovino Bio-Oss^{®4} na reparação de lesões ósseas Rochkind et al. (2004) produziram cavidades com brocas de 3 mm de diâmetro em processos alveolares de mandíbula de 29 ratos machos *Wistar*. Os animais foram divididos em quatro grupos: G1 (controle lado esquerdo osso intacto e lado direito defeito ósseo); G2 (Bio-Oss[®]); G3 (Laser He-Ne); G4 (Bio-Oss[®] + Laser He-Ne). O laser foi aplicado por 20 minutos diariamente por 14 dias consecutivos. A dose total não foi relatada no estudo. Após duas semanas os animais foram mortos. As peças ósseas foram analisadas pela técnica de espectroscopia no infravermelho e por um índice de mineralização. O índice de mineralização foi maior no grupo em que foi utilizado o Bio-Oss[®] em combinação com a laserterapia de baixa potência, seguidos pelo grupo que recebeu somente a laserterapia, depois pelo grupo que recebeu somente o Bio-Oss[®] e finalmente pelo grupo controle.

³ Baumer - Mogi Mirim-SP-Brasil

⁴ Geistlich Pharma AG

No estudo de Khadra et al. (2004) o objetivo foi investigar o efeito da laserterapia de baixa potência com um laser de diodo de AsGaAl (λ 830 nm) aplicado na cicatrização de implantes de titânio. O tempo de cicatrização foi de oito semanas. Dois discos de implante de titânio com diâmetro de 6,25 mm e altura de 1,95 mm foram implantados na cortical óssea de cada tíbia proximal de 12 coelhos fêmeas da Nova Zelândia (n= 48). Os animais foram divididos aleatoriamente em grupo irradiado e grupo controle. A laserterapia de baixa potência foi usada imediatamente após a cirurgia e a cada dois dias por 10 dias. Os animais foram mortos após oito semanas de cicatrização. A média de força tensional mensurada em Newton no grupo irradiado foi de 14,35N e no grupo teste foi de 10,27N, sugerindo um ganho na integração. A avaliação histomorfométrica sugere que o grupo irradiado teve um maior contato osso-implante que o grupo controle. A porcentagem de cálcio e fósforo foi significativamente maior no grupo irradiado quando comparados com o grupo controle. Os resultados deste estudo sugerem que um aumento da resistência mecânica na interface pode ser devido à laserterapia de baixa potência com AsGaAl. Pode ser um efeito observado devido a um aumento na velocidade metabólica, resultando em um processo mais rápido de reparo.

O efeito do laser diodo (GaAlAs; λ 830 nm) no processo de reparo de defeitos ósseos criados em ratos da linhagem *Wistar* submetidos a implante de osso bovino liofilizado (matriz orgânica) (Gen-ox[®]), associado ou não à membrana biológica de osso bovino liofilizado desmineralizado (Gen-derm^{®5}), foi avaliado histologicamente por Gerbi et al. (2005). Foram criados defeitos cirúrgicos padronizados de 3 mm de diâmetro nos fêmures de 42 ratos divididos em 5 grupos: grupo I (controle n=6); grupo II (Gen-ox[®] n=9); grupo III (Gen-ox[®] + Laser n=9); grupo IV (Gen-ox[®] + Gen-derm[®] n=9); grupo V (Gen-ox[®] + Gen-derm[®] + Laser n=9). Os animais dos grupos irradiados receberam 16 J/cm² por sessão dividido em quatro pontos em volta de cada defeito (4 J/cm²) iniciando a primeira irradiação imediatamente após a cirurgia e repetida 7 vezes a cada 48 horas, perfazendo um total de 128 J/cm². Os animais foram mortos com 15, 21 e 30 dias. Foi realizada a análise histológica de lâminas coradas com hematoxilina e eosina e Picrosirius. Os resultados demonstraram que, nas feridas cirúrgicas irradiadas, ficaram evidenciadas maior concentração de fibras colágenas, no início do período (15 dias) e maior neoformação óssea, com um trabeculado mais denso e organizado, no final do período (30 dias), quando comparados com os grupos não-irradiados. Concluíram que há um efeito positivo

⁵ Baumer - Mogi Mirim-SP-Brasil

biomodulativo no processo de cicatrização de defeitos ósseos associados ou não ao uso de osso orgânico bovino liofilizado e membrana biológica bovina liofilizada no fêmur de ratos.

Em outro estudo para avaliar o efeito do laser de He-Ne (λ 632,8 nm) Stein et al. (2005) realizaram 48 culturas de osteoblastos humanos. Sendo 24 culturas de controle e 24 com aplicação laser. A aplicação do laser foi em duas sessões. Foram utilizados três protocolos diferentes de dosagem 0.14, 0.43 e 1.43 J/cm². Os resultados obtidos após 24 e 48 horas do término da aplicação do laser demonstraram um aumento significativo de 31% a 58% na sobrevivência das células. Obtiveram um aumento em dobro da atividade e expressão dos marcadores osteogênicos utilizados no estudo, tais como: fosfatase alcalina, osteopontina, sialoproteína óssea. Os autores concluíram que o laser promoveu proliferação e maturação de osteoblastos humanos *in vitro*.

O efeito da irradiação com laser de baixa potência (AsGaAl – λ 670 nm) no reparo ósseo de fêmures de ratos foi investigado por Merli et al. (2005). Foram utilizados 10 ratos *Wistar* machos, sendo realizado um defeito ósseo de 2 mm de diâmetro em cada fêmur (um total de 20 defeitos ósseos). Os fêmures do lado esquerdo receberam 3 J/cm² no transoperatório (antes da sutura) e após a sutura foram irradiados mais 6 J/cm² no lado esquerdo. No mesmo animal o fêmur do lado direito foi observado como controle. O laser foi aplicado novamente da mesma forma (6 J/cm²) nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. A dose total foi de 27 J/cm². Os ratos foram mortos após 14 dias e os resultados foram analisados usando um método histomorfométrico quantitativo, que revelou um acúmulo mais rápido de novo osso reparativo nos defeitos ósseos dos fêmures irradiadas.

A influência da radiação laser GaAlAs (λ 830 nm) no processo de cicatrização de enxertos ósseos autógenos em ratos foi avaliada histologicamente por Weber et al. (2006). Foram utilizados 60 ratos *Wistar* e criados defeitos ósseos padronizados divididos quatro grupos: G1 (controle); G2 (Laser no leito cirúrgico); G3 (Laser no enxerto); G4 (Laser no leito cirúrgico e no enxerto). A dose por sessão foi de 10 J/cm² (fracionada em quatro pontos de 2,5 J/cm² cada) e foi aplicado no leito cirúrgico (G2 e G4) e no enxerto ósseo (G3 e G4). Após foram aplicadas a mesma dose a cada 48 horas durante 15 dias. Portanto os grupos G2 e G3 receberam uma dose total de 80 J/cm² e o grupo G4 recebeu 90 J/cm². Os animais foram mortos com 15, 21 e 30 dias. Foi realizado análise histológica descritiva e semi-quantitativa. Nos grupos em que o laser foi aplicado no leito cirúrgico no transoperatório (G2-G4), a reabsorção óssea foi mais intensa. A

neoformação óssea foi também mais significativa tanto quantitativamente como qualitativamente, confirmando os efeitos de biomodulação da laserterapia de baixa potência.

Com o objetivo de avaliar, por meio de análise histológica e histomorfométrica computadorizada, a biomodulação do processo de reparo ósseo nas regiões de periósteo, endósteo e medula óssea Guimarães et al. (2006) confeccionaram defeitos ósseos de 2,5 mm em fêmures de 27 ratos, sendo que 14 foram submetidos à radiação com laser diodo infravermelho (GaAlAs; λ 830 nm), e 13 serviram como controle sem irradiação. Os animais foram mortos com 7, 15 e 21 dias e as doses totais de radiação foram respectivamente de 24, 48 e 66 J/cm². Os resultados obtidos demonstraram que, nos grupos em que o laser foi aplicado a atividade de remodelação óssea foi quantitativamente maior, com maior maturação da matriz óssea orgânica e padrões de osteogênese avançados, nos períodos iniciais do experimento. Além disso, segundo a análise histomorfométrica, a biomodulação óssea positiva evidenciada nos grupos irradiados apresentou maior média de trabeculado ósseo quando comparada aos grupos não submetidos à laserterapia de baixa potência. O mapeamento morfométrico evidenciou a produção de estímulos biomoduladores positivos com maiores médias de trabéculas ósseas, maiores graus de osteogênese na região do periósteo. Nas regiões do endósteo e medula óssea a laserterapia não foi eficaz. O maior potencial de penetração, estimulação e aceleração da consolidação óssea ocorreu na região periosteal e na região cortical do defeito ósseo. Os resultados permitiram concluir que, a laserterapia de baixa potência no protocolo estabelecido atua como biomoduladora óssea em região de periósteo, podendo ser utilizada como coadjuvante no processo de reparo ósseo.

Para avaliar as características microscópicas do efeito do laser diodo infravermelho (GaAlAs; λ 830nm), aplicado no período de ativação e consolidação de mandíbulas submetidas à distração osteogênica Cerqueira et al. (2007) submeteram dezoito ovelhas a procedimento cirúrgico para colocação de distrator ósseo em região de mandíbula do lado esquerdo, sendo divididos em três grupos: 1 – Controle; 2 – Irradiação de laser no período de ativação; 3 – Irradiação de laser no período de contenção. As irradiações foram feitas em cinco sessões em dias alternados, com doses de 4,0 J/cm² em quatro pontos pré-determinados, somando 16 J/cm² por sessão, com uma dose total de 80 J/cm². Após quatro dias de latência no pós-operatório, 10 dias de ativação do distrator (1 mm/dia) e 21 dias de contenção os animais foram mortos e as peças removidas para análise microscópica histológica descritiva. Os resultados demonstraram que os grupos irradiados apresentaram maior disposição de trabéculas ósseas mineralizadas em relação

ao grupo controle, contudo, no Grupo 2 foi observada a presença de tecido cartilaginoso. Concluíram que o laser atuou de forma mais favorável quando utilizado no período de consolidação, após o alongamento ósseo.

Foi realizado um estudo experimental por Jakse et al. (2007) com o objetivo de avaliar se a laserterapia de baixa potência aumenta a regeneração óssea e a osseointegração de implantes dentais em enxertos de seio maxilar. Doze ovelhas foram utilizadas neste estudo sendo realizados 24 levantamentos de assoalho do seio maxilar e enxerto com osso medular da crista ilíaca. A inserção dos implantes foi realizada após quatro semanas (seis ovelhas) e após 12 semanas (seis ovelhas). Dezesesseis semanas após o segundo estágio de cirurgia os animais foram mortos. Unilateralmente, o seio enxertado e durante o segundo estágio das cirurgias dos sítios dos implantes eram irradiados no transoperatório e três vezes na primeira semana pós-operatória com um laser diodo (λ 680 nm, 75 mW). A média de densidade de energia por irradiação foi de 3-4 J/cm². Biópsia da área do enxerto foi obtida durante a cirurgia de implante e após o sacrifício dos animais. Foram realizadas análises histomorfométricas. Não foi confirmado um efeito positivo da laserterapia na regeneração óssea com um enxerto medular no seio maxilar. Possivelmente a laserterapia tem um efeito positivo na osseointegração de implantes dentais inseridos após o aumento ósseo sinusal, pois após quatro semanas foi demonstrada a média de 31,3% de osso periimplantar no lado controle, e 36,5% no lado teste, e após 12 semanas havia a média de 27,9% de tecido ósseo periimplantar no lado controle, enquanto que o lado teste apresentava 32,4%. Quanto à porcentagem de lacunas contendo osteócitos nas paredes dos seios maxilares: após quatro semanas foram encontradas média de 41,8% (variando de 27,4% a 63,24%) no lado controle, e de 48,6 % (de 32,54% a 69,24%) no lado irradiado. Após 12 semanas foram encontrados a média de 54,6% no lado controle (de 22,15% a 69,24%) a 57,9% (45,95% a 70,91%) no lado irradiado. A análise histomorfométrica indicou um leve impacto positivo laserterapia na porcentagem de osteócitos nas lacunas ósseas.

Com o objetivo de investigar histologicamente os efeitos da fotobiomodulação (λ 790 nm) no reparo de enxertos ósseos Torres et al. (2008) dividiram 24 ratos *Wistar* em quatro grupos onde realizou defeitos ósseos de 5 mm no fêmur: grupo I controle; grupo II laserfotobiomodulação e enxerto ósseo; grupo III proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) e enxertos ósseos; grupo IV laserfotobiomodulação no leito ósseo e enxerto ósseo + BMPs. Quando o leito estava apropriado o grupo BMPs foi coberto com osso bovino liofilizado e BMPs

usados com ou sem membranas de regeneração óssea guiada. Os animais dos grupos irradiados receberam 10 J/cm^2 por sessão dividida em quatro pontos em volta do defeito ($2,5 \text{ J/cm}^2$ por ponto), com a primeira irradiação imediatamente após a cirurgia e repetida a cada 48 horas num total de oito vezes (G II) e nove vezes (G IV). As doses totais foram de 80 J/cm^2 (G II) e 90 J/cm^2 (G IV). Os animais foram mortos após 40 dias. Foi realizada análise histológica e microscópica semi-quantitativa.

No tópico infiltrado inflamatório os critérios semi-quantitativos utilizados foram:

Discreto – presença de menos de 25% de infiltrado inflamatório.

Moderado – presença de 25% a 50% de infiltrado inflamatório.

Intenso – presença de mais de 50% de infiltrado inflamatório.

No tópico deposição de colágeno os critérios semi-quantitativos utilizados foram:

Discreto – presença de menos de 25% de deposição de colágeno.

Moderado – presença de 25% a 50% de deposição de colágeno.

Intenso – presença de mais de 50% de deposição de colágeno.

No tópico reabsorção óssea os critérios semi-quantitativos utilizados foram:

Discreto – presença de menos de 25% de reabsorção óssea.

Moderado – presença de 25% a 50% de reabsorção óssea.

Intenso – presença de mais de 50% de reabsorção óssea.

No tópico formação de novo osso os critérios semi-quantitativos utilizados foram:

Discreto – presença de menos de 25% de formação de novo osso.

Moderado – presença de 25% a 50% de formação de novo osso.

Intenso – presença de mais de 50% de formação de novo osso.

Os resultados demonstraram que em todos os grupos tratados, a nova formação óssea era maior e quantitativamente melhor que no grupo não tratado. O grupo controle demonstrou um reparo inferior. Concluíram que laserfotobiomodulação teve um efeito positivo biomodulatório na cicatrização de defeitos ósseos, e isto era mais evidente quando a irradiação é realizada no leito cirúrgico no transoperatório. Observaram também um efeito positivo quando comparado com o grupo controle e principalmente quando foi utilizado enxerto ósseo autógeno juntamente com a fotobiomodulação.

Pinheiro et al. (2009) realizaram um estudo com o objetivo de investigar através de análise histológica descritiva e semi-quantitativa os efeitos do laser de fotobiomodulação no reparo de defeitos cirúrgicos de 3 mm criados nos fêmures de ratos.

No tópicos infiltrado inflamatório os critérios semi-quantitativos utilizados foram:

Discreto – presença de menos de 25% de infiltrado inflamatório.

Moderado – presença de 25% a 50% de infiltrado inflamatório.

Intenso – presença de mais de 50% de infiltrado inflamatório.

No tópicos deposição de colágeno os critérios semi-quantitativos utilizados foram:

Discreto – presença de menos de 25% de deposição de colágeno.

Moderado – presença de 25% a 50% de deposição de colágeno.

Intenso – presença de mais de 50% de deposição de colágeno.

No tópicos reabsorção óssea os critérios semi-quantitativos utilizados foram:

Discreto – presença de menos de 25% de reabsorção óssea.

Moderado – presença de 25% a 50% de reabsorção óssea.

Intenso – presença de mais de 75% de reabsorção óssea.

No tópicos formação de novo osso os critérios semi-quantitativos utilizados foram:

Discreto – presença de menos de 25% de formação de novo osso.

Moderado – presença de 25% a 50% de formação de novo osso.

Intenso – presença de mais de 50% de formação de novo osso.

Quarenta e cinco ratos foram divididos em quatro grupos: grupo I (controle); grupo II (laser de fotobiomodulação λ 830 nm, 40 mW - LBPM); grupo III (regeneração óssea guiada com hidroxiapatita- HA GBR); grupo IV (HA GBR +LPBM). Os animais nos grupos irradiados foram submetidos a uma primeira irradiação imediatamente após o término da cirurgia, e isto foi repetido a cada dois dias por 15 dias, perfazendo sete aplicações com a dose total de 112 J/cm². Os animais foram mortos com 15, 21 e 30 dias após a cirurgia. Quando foram comparados os grupos III e IV, o grupo IV aos quinze dias apresentou um reparo mais rápido. Aos 30 dias os resultados foram similares para os grupos irradiados e não irradiados. O estudo sugere que a terapia de fotobiomodulação a laser pode ter um efeito positivo na cicatrização precoce de defeitos ósseos combinado com hidroxiapatita (HA) e regeneração óssea guiada (GBR).

AboElsaad et al. (2009) investigaram a influência do laser de baixa potência de λ 830 nm de arseneto de gálio-alumínio (GaAlAs) (ondas contínuas de 40 mW e 4 J/cm², com densidade

total de energia de 16 J/cm^2) na cicatrização de defeitos infra-ósseos em humanos tratados com material de enxerto de vidro bioativo. Vinte pacientes com periodontite crônica e defeitos infra-ósseos foram incluídos no estudo. Foram tratados 20 defeitos com vidro bioativo e irradiação com laser durante o procedimento cirúrgico e nos dias 3, 5 e 7 de pós-operatório. No lado contralateral foram tratados 20 defeitos somente com vidro bioativo. Sondagem clínica da profundidade de bolsa, inserção clínica, e radiografias periapicais padronizadas foram registradas como valor padrão e após três e seis meses de pós-operatório. Após três meses houve uma diferença estatística significativa entre os sítios com laserterapia e sem laserterapia nos parâmetros investigados. Embora, após seis meses, não foram observadas diferenças. Os resultados confirmaram os efeitos positivos do laser de baixa potência na aceleração da cicatrização dos defeitos periodontais, principalmente nos períodos iniciais.

Campanha et al. (2010) realizaram um estudo com o objetivo de observar a influência do laser infravermelho de baixa potência (λ 830 nm) no valor do torque de remoção de implantes sem estabilidade inicial instalados em tibia de coelho. O modelo animal utilizado foram 30 coelhos brancos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus Cuniculos*). Foram instalados implantes de superfície usinada com liberdade rotacional na tibia de cada coelho. Eles foram distribuídos de forma aleatória em dois grandes grupos, não irradiados e irradiados com laser (sete aplicações de 86 J/cm^2 cada sessão, com uma dose total de 602 J/cm^2), os quais se subdividiam em três grupos, de acordo com o dia em que foram mortos – 15, 30 ou 45 dias. Os valores dos torques foram obtidos através de um torquímetro digital axial, o qual promovia um contra-torque. Foram obtidas as médias e os desvios-padrão de cada grupo, sendo utilizado o Teste t de Student, para comparação entre grupos laser e controle. Observou-se um significativo ($p = 0,05$) aumento nos torques de remoção dos implantes irradiados com laser com 15 e 30 dias comparativamente aos grupos controle. Aos 45 dias não foram observadas diferenças significativas. Neste estudo observou-se uma contribuição da laserterapia na osseointegração dos implantes sem estabilidade inicial, principalmente nos estágios precoces da reparação óssea.



Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar por meio de microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) os efeitos da laserterapia de baixa potência na incorporação de aloenxertos ósseos em bloco processados por congelamento profundo e implantados em coelhos, analisados em dois períodos distintos de reparação.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os efeitos da biomodulação da laserterapia de baixa potência no aloenxerto ósseo processado por congelamento profundo na deposição de fibras colágenas, na remodelação óssea, no preenchimento das lacunas osteocíticas, na incorporação do enxerto na interface e no infiltrado inflamatório.
- Analisar a viabilidade do método proposto de processamento por congelamento profundo do aloenxerto ósseo.



Metodologia

4 METODOLOGIA

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto desta pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) sob protocolo de nº 1.04/08 (ANEXO A), pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) sob o nº 0068/08 (ANEXO B) e pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS sob o registro CEUA 09/00112 (ANEXO C).

Nesta pesquisa foram observadas as Normas para o Uso Científico de Animais, que consta na LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, respeitando-se também os Princípios Éticos na Pesquisa Experimental, determinados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

4.2 CARACTERIZAÇÃO

A pesquisa foi realizada junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, área de concentração CTBMF, da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), como parte integrante da Linha de Pesquisa Laser em Odontologia.

4.3 MODELO ANIMAL E ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para esta pesquisa foram utilizados 14 coelhos da raça Nova Zelândia, espécie *Oryctolagus cuniculus*, da ordem *Lagomorpha*, gênero *Oryctolagus*, fêmeas, adultas (idade entre oito e 10 meses), pesando entre 3,5 e 4,5 Kg. Os animais selecionados foram obtidos e mantidos, até o final do experimento, junto ao Biotério da Universidade do Estado de Santa Catarina

(UDESC) em Lages (SC). Os procedimentos de manipulação e alimentação foram realizados, seguindo a rotina do Biotério.

Durante todo o experimento, os animais permaneceram em alojamento com temperatura, umidade e iluminação controladas. Os animais permaneceram em gaiolas individuais devidamente identificadas e apropriadas ao tamanho de cada animal e suspensas, que evitou o contato direto com urina e fezes. A dieta foi instituída com ração específica para a espécie e água *ad libitum*.

4.3.1 Coelhos doadores dos blocos ósseos

Foram utilizados dois coelhos da raça Nova Zelândia como doadores do tecido ósseo em que foram retirados seis blocos da calvária com 8 mm de diâmetro em cada um, totalizando 12 blocos que após o congelamento profundo serviram como aloenxertos.

Os enxertos ósseos utilizados neste experimento provenientes da calvária de coelhos são ossos classificados como chatos, que apresentam duas camadas de osso cortical que delimitam uma região central de osso esponjoso, que entre suas trabéculas aloja a medula óssea (KATCHBURIAN e ARANA, 2004).

4.3.2 Coelhos receptores dos blocos ósseos

Os doze coelhos receptores passaram por um período de adaptação de 72 horas, e foram sorteados aleatoriamente para compor os grupos de acordo com o tratamento (laserterapia ou controle) e com o período de cicatrização e morte dos animais (35 ou 70 dias).

Foram formados os seguintes grupos nos modelos experimentais com aloenxertos em bloco implantados no lado direito da calvária de cada animal: três animais com tratamento de aloenxerto ósseo e de laserterapia com 35 dias de cicatrização (L alo 35); três animais com tratamento de aloenxerto ósseo e sem laserterapia com 35 dias de cicatrização (C alo 35); três animais com tratamento de aloenxerto ósseo e de laserterapia com 70 dias de cicatrização (L alo 70); três animais com tratamento de aloenxerto ósseo e sem laserterapia com 70 dias de cicatrização (C alo 70).

Além destes grupos foram formados grupos de controle positivo (com blocos autógenos) implantados no lado esquerdo da calvária dos mesmos animais do aloenxertos e da mesma forma: três animais com tratamento de autoenxerto ósseo e de laserterapia com 35 dias de cicatrização (L auto 35); três animais com tratamento de autoenxerto ósseo e sem laserterapia com 35 dias de

cicatrização (C auto 35); três animais com tratamento de autoenxerto ósseo e de laserterapia com 70 dias de cicatrização (L auto 70); três animais com tratamento de autoenxerto e sem laserterapia com 70 dias de cicatrização (C auto 70).

Quadro 1 – Organização dos grupos experimentais

Grupos	Tipo de tratamento	Tipo de enxerto	Número de dias de incorporação	Número de animais
C alo 35	Controle	Aloenxerto	35 dias	3 coelhos
L alo 35	Laserterapia	Aloenxerto	35 dias	3 coelhos
C alo 70	Controle	Aloenxerto	70 dias	3 coelhos
L alo 70	Laserterapia	Aloenxerto	70 dias	3 coelhos
C auto 35	Controle	Autoenxerto (controle +)	35 dias	3 coelhos (mesmo coelho do C alo 35)
L auto 35	Laserterapia	Autoenxerto (controle +)	35 dias	3 coelhos (mesmo coelho do L alo 35)
C auto 70	Controle	Autoenxerto (controle +)	70 dias	3 coelhos (mesmo coelho do C alo 70)
L auto 70	Laserterapia	Autoenxerto (controle +)	70 dias	3 coelhos (mesmo coelho do L alo 70)

4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO NOS ANIMAIS DOADORES

Para a realização desta pesquisa foram obedecidos os princípios de biossegurança e controle de infecção. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Centro Cirúrgico do Hospital Veterinário da UDESC.

As cirurgias ocorreram de forma independente, sobre uma bancada protegida por um campo de mesa estéril descartável e trocado, juntamente com os materiais e instrumentais cirúrgicos, a cada animal. Os animais foram submetidos a um período de jejum alimentar de 5 horas e hídrico de 3 horas previamente ao procedimento experimental. Foi realizada tricotomia da região da cabeça localizada entre a região frontal, parietal e a zigomática para o procedimento cirúrgico; além da região pavilhão auricular dorsal, para canulação da veia marginal da orelha.

Na sala de pré-anestesia, após a aferição do peso, parâmetros clínicos como frequência respiratória, cardíaca e tempo de perfusão capilar os animais foram pré-medicados com Tiletamina + Zolazepam (Zoletil 100^{®6}) na dose de 20mg/Kg e Xilazina (Anasedan^{®7}) 3mg/kg administrados por via intramuscular. Após o efeito da medicação pré-anestésica os animais foram posicionados em decúbito esternal sobre colchão térmico ativo, sendo a veia marginal da orelha canulada com cateter de polietileno 24G para administração de soro fisiológico 0,9% a 6 gotas/minuto. A manutenção da anestesia foi realizada com através de uma mascara acoplada a um sistema sem reinalação de gases com administração de Isoflurano (Isoforine^{®8}) 1 a 1,5 CAM (concentração alveolar mínima) diluído em oxigênio a 100%, com fluxo de 2L/min. através de um vaporizador universal (Oxygel^{®9}). Foi realizada também a anestesia infiltrativa com 0,5ml de lidocaína (2%) (Xylestesin^{®10}) sem vasoconstritor na região frontoparietal. (Figura 1).

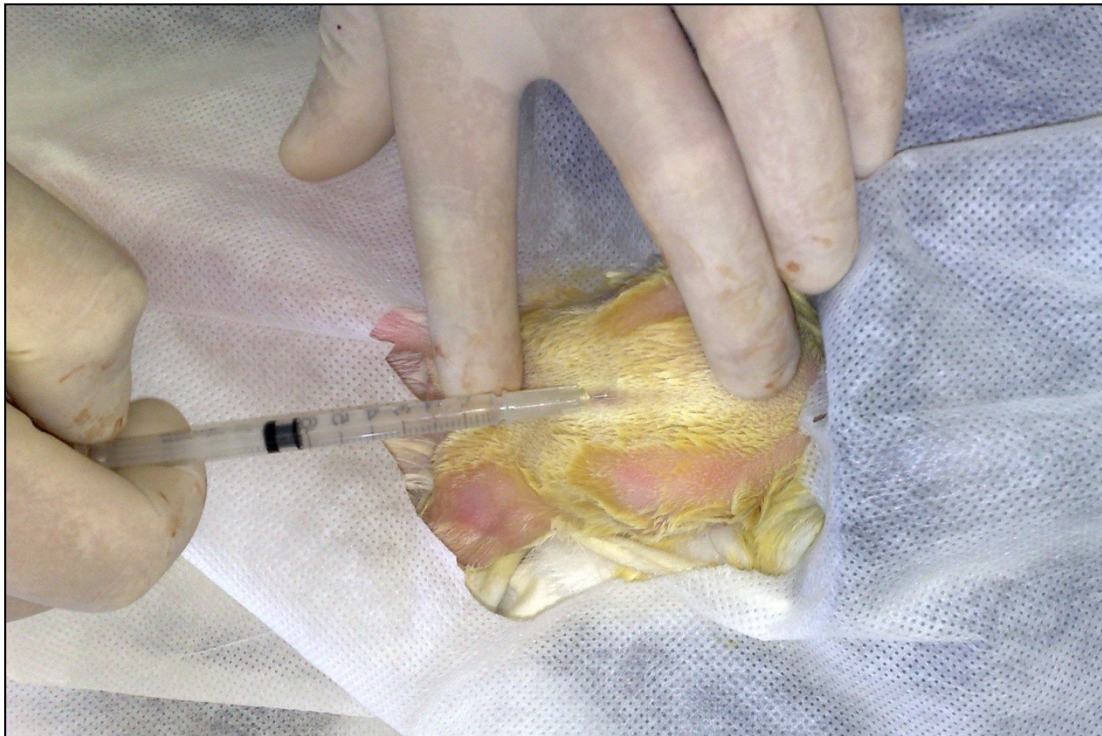


Figura 1 – Infiltração anestésica na região frontoparietal.

⁶ Virbac Saude Animal, São Paulo, SP-Brasil

⁷ Vetbrands Saude Animal, Paulinia, SP-Brasil

⁸ Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP-Brasil

⁹ Oxygel[®], São Paulo, SP-Brasil

¹⁰ Cristália Produtos químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP-Brasil

A antissepsia da pele foi realizada com polivinilpirrolidona-iodo a 1% (Povidine^{®11}) e os campos cirúrgicos estéreis isolaram a área operatória.

A incisão foi realizada com espessura total incluindo o periósteo com lâmina nº15 com aproximadamente 5 cm sobre a sutura sagital e centro do frontal (Figura 2).



Figura 2 - Incisão sobre a sutura sagital e centro do frontal.

¹¹ Johnson Diversey – São Paulo – SP- Brasil

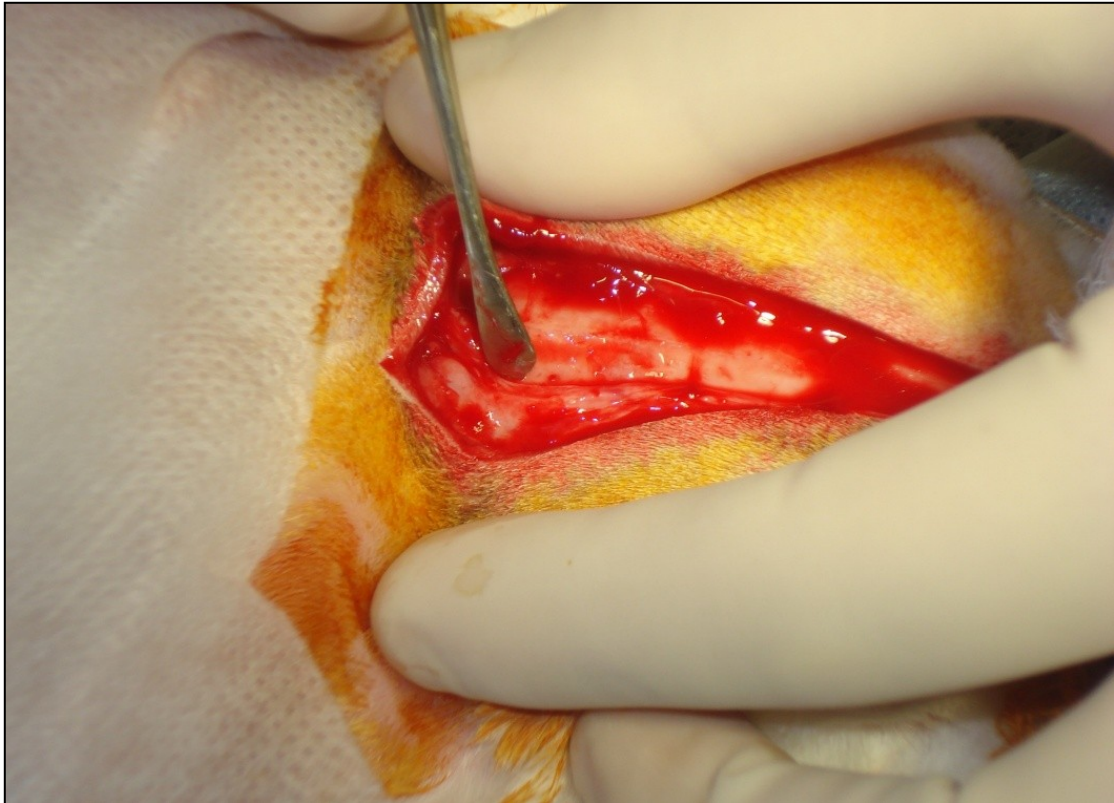


Figura 3 - Dissecção dos tecidos moles com descolador freer.

Após foi realizada a dissecção dos tecidos moles com descolador freer (Golgran^{®12}) (Figura 3).

¹² Golgran – São Paulo – SP- Brasil

Nos coelhos doadores a ostectomia para a retirada dos blocos da calvária foi realizada com um motor cirúrgico (Kavo^{®13}) e peça-de-mão reta (Kavo[®]) com rotação de 800 rpm e com uma trefina de 8 mm (Neodent^{®14}) sob irrigação abundante com soro fisiológico (Figura 4).

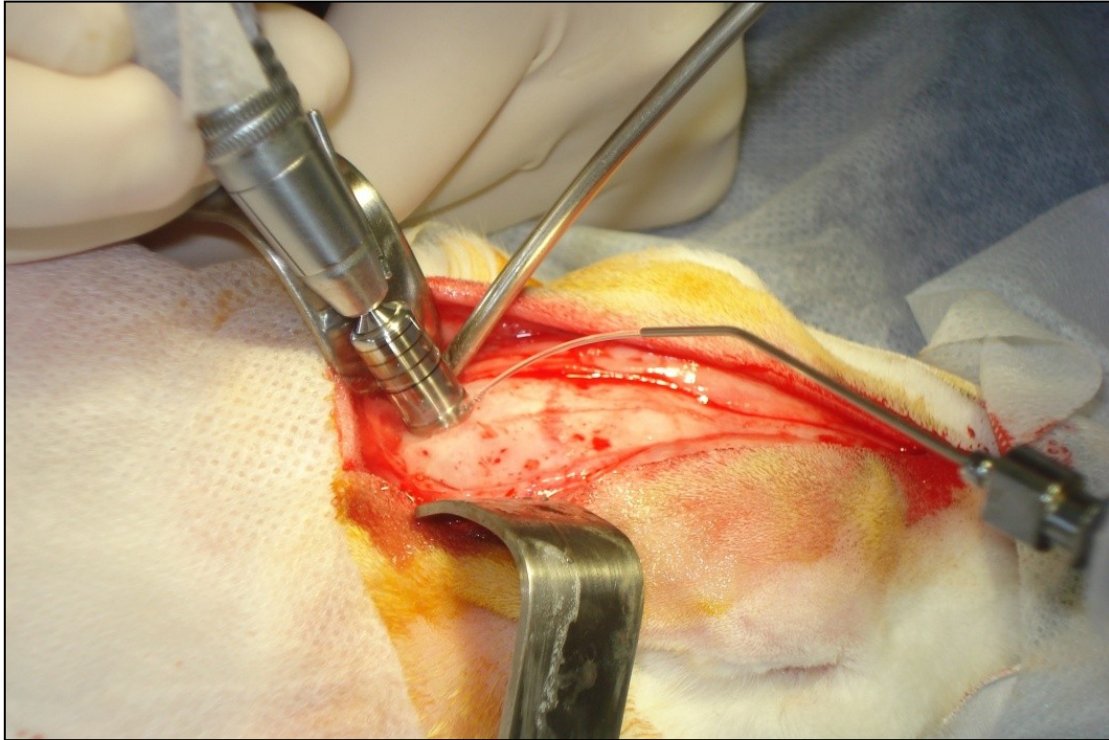


Figura 4 - Ostectomia para a retirada dos blocos da calvária.

¹³ Kavo do Brasil Ind. Com. Ltda, Joinville-SC-Brasil

¹⁴ Neodent – Curitiba – PR - Brasil

O bloco de enxerto ósseo foi cuidadosamente elevado com um descolador freer (Golgran[®]) mantendo a integridade da dura-máter e do cérebro (Figura 5).

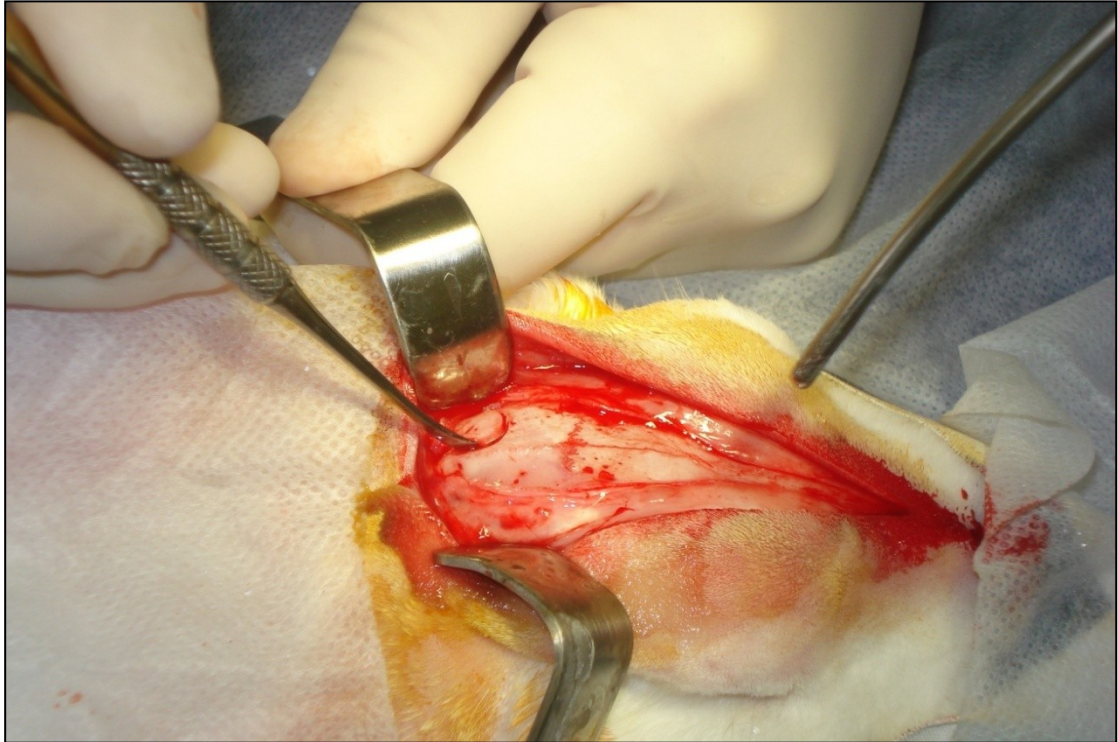


Figura 5 - Enxerto ósseo sendo retirado da calvária do coelho doador.

Foram retirados seis blocos de osso da calvária de cada coelho doador (Figura 6), totalizando 12 blocos para aloenxertos ósseos.

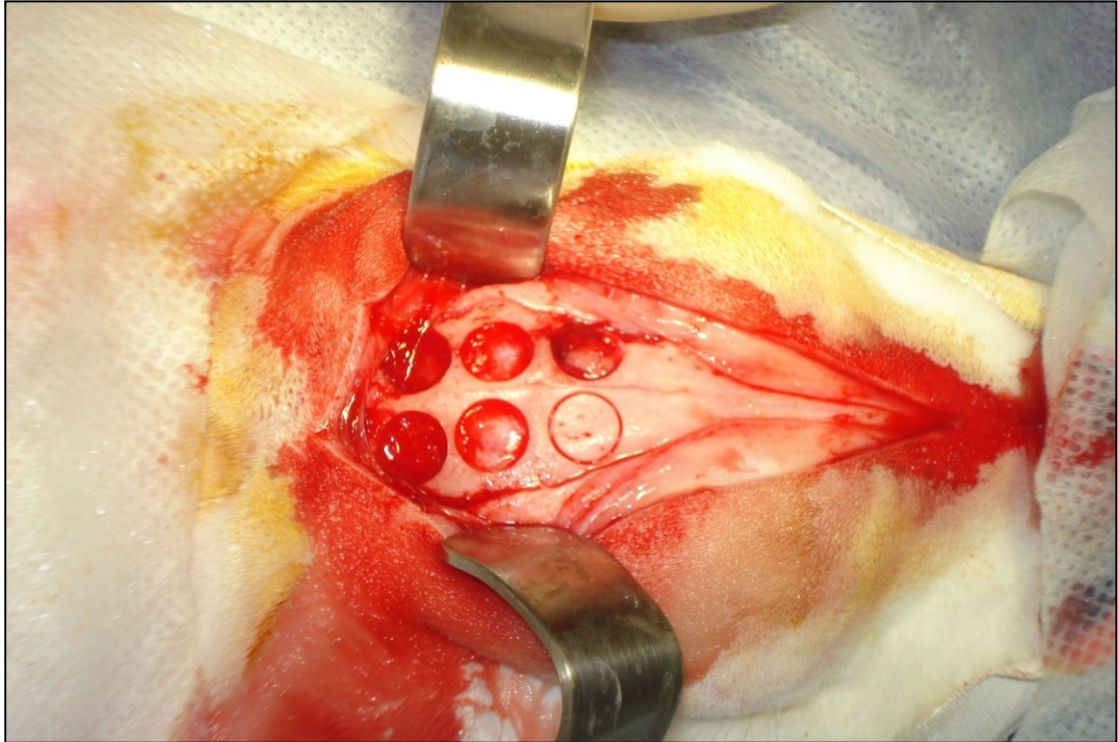


Figura 6 - Remoção de seis blocos de osso da calvária de cada coelho doador.

Após a retirada dos blocos ósseos o protocolo de morte para os animais doadores foi a associação de Tiletamina + Zolazepam (Zoletil 100[®]) 20mg/kg e Xilazina (Anasedan[®]) 3mg/kg por via Intramuscular, seguido de 300mg de cloreto de potássio (Cloreto de Potássio 10%¹⁵) por via intravenosa na veia marginal da orelha.

4.5 PROCESSAMENTO POR CONGELAMENTO PROFUNDO DOS BLOCOS DE ENXERTOS ÓSSEOS

Os blocos ósseos retirados foram lavados copiosamente com soro fisiológico para remover o sangue, fluídos teciduais e espículas ósseas. Utilizando descoladores tipo freer (Golgran[®]) foram removidos os tecidos moles aderidos ao tecido ósseo para minimizar reações imunológicas. Após os blocos ósseos foram acondicionados em embalagens estéreis individuais

¹⁵ Cristália Produtos químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP-Brasil

tipo Microtubo Eppendorf^{®16}, cor neutra, volume de 1.5 ml, tampa lisa. As embalagens com os blocos ósseos foram identificadas com o protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal, número do animal (1 ou 2) e a data do procedimento de coleta. Os blocos ósseos alógenos foram congelados e mantidos sob temperatura constante em congelamento profundo a -70°C em freezer apropriado (Revco^{®17}) no Laboratório da UDESC, por 30 dias antes das cirurgias de enxerto.

NATHER (2003) afirma que o processamento por congelamento profundo é importante para reduzir a imunogenicidade ocasionada principalmente pelas células da medula óssea, que após duas semanas de congelamento profundo devem estar mortas caracterizando um aloenxerto ósseo que ocasione pouca ou nenhuma reação de antigenicidade. O protocolo recomendado é o congelamento profundo por no mínimo 30 dias.

Segundo ANDRADE et al. (2008) na pesquisa em coelhos, com relação ao tempo de congelamento no osso cortical sob a temperatura de -70°C a mais importante redução da área de núcleos de osteócitos no osso cortical ocorre aos 30 dias de congelamento e se mantêm o mesmo durante os outros dias de observação, sem comprometer a morfologia tecidual. O colágeno do osso cortical sofre desnaturação proporcional ao decréscimo de temperatura e a duração do congelamento. Estas alterações comprometem a morfologia tecidual após 90 ou 120 dias de congelamento sob a temperatura de -70°C .

4.6 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO NOS ANIMAIS RECEPTORES

Após 30 dias os coelhos receptores foram anestesiados da mesma forma dos doadores e os procedimentos de incisão e descolamento do retalho foram os mesmos.

Os blocos alógenos foram retirados das embalagens estéreis e descongelados com soro fisiológico em temperatura ambiente por 30 minutos. Após foram perfurados com broca de 1,6 mm (Neodent[®]) e fixados na calvária com um parafuso autoperfurante de 1,5 mm de diâmetro por 6 mm de comprimento (Neodent[®]) no lado direito inserido através de chave de mão e conexão Philips (Neodent[®]). Da região mais anterior da calvária foi retirado com a trefina de 8 mm um enxerto em bloco autógeno para servir como controle positivo da incorporação óssea, e

¹⁶ Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo, SP-Brasil

¹⁷ Revco Technologies, Asheville - NC - USA

este foi fixado no lado esquerdo da mesma forma que o bloco alógeno. Os parafusos foram ancorados bicorticalmente (Figura 7).

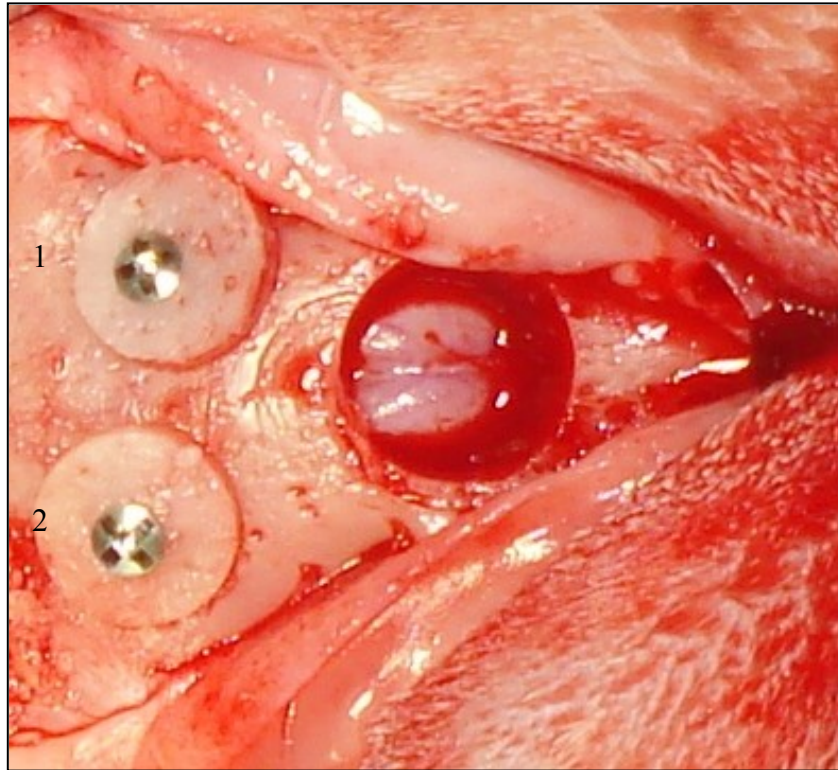


Figura 7 - Bloco autógeno (1) e alógeno (2) fixados com parafuso bicortical de 6 mm.

Após irrigação abundante, com soro fisiológico, para a limpeza do leito operatório, a ferida cirúrgica foi fechada em um plano tecidual, com sutura no local com fio de nylon 5-0 (Ethicon^{®18}), de modo contínuo.

Foi instituído antibioticoterapia com Enrofloxacin (Chemitril^{®19} 2,5%) por via intramuscular na dose de 5mg/Kg a cada 24h durante 5 dias. A analgesia pós-operatória foi instituída com Meloxicam (Maxicam^{®20} 0,2%) 0,1mg/kg intramuscular por 3 dias a cada 24h. Em casos em que os animais manifestassem dor intensa uma dose de resgate com Tramadol 2mg/Kg (Tramadol^{®21} 50mg/ml) foi administrado via intramuscular.

O procedimento foi repetido de forma idêntica para todos os animais.

¹⁸Johnson & Johnson Company. São José dos Campos, SP-Brasil

¹⁹ Chemitec Agro-veterinária Ltda, Jaboticabal, SP-Brasil

²⁰ Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Cravinhos, SP-Brasil

²¹ Cristália Produtos químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP-Brasil

Após o término das cirurgias, que foram realizadas por um único operador, os animais permaneceram no biotério da UDESC, sob cuidados dos pesquisadores e orientação de Médicos Veterinários.

4.7 PROTOCOLO DE LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA

Imediatamente, ao término da cirurgia os grupos L (laser) receberam a irradiação com laser infravermelho de baixa potência, e posteriormente a cada 48 horas uma nova aplicação, durante 14 dias, totalizando oito aplicações.

Os grupos C (Controle) foram submetidos a uma falsa irradiação com o aparelho desligado, para simular o estresse da contenção.

Os parâmetros de energia empregados foram: aplicação de laser de diodo de arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs) – comprimento de onda de 830 nm - de 4 J/cm² na potência de 100 mW, em modo contínuo (Thera Lase^{®22}) em 4 pontos com a ponteira num ângulo de 90° a 0,5 cm anterior, posterior, lateral esquerda e direita dos blocos de enxertos ósseos, perfazendo um total de 16 J/cm² por aplicação. A dose total do tratamento após as oito aplicações foi de 128 J/cm².

4.8 PROTOCOLO PARA A MORTE DOS ANIMAIS E REMOÇÃO DAS AMOSTRAS

Os procedimentos de morte dos animais ocorreram com três animais de cada grupo (laser e controle) nos períodos de 35 dias (cinco semanas) e três animais de cada grupo (L e C) no período de 70 dias (10 semanas) após a realização dos enxertos. O protocolo de morte foi a associação de Tiletamina + Zolazepam (Zoletil 100[®]) 20mg/kg e Xilazina (Anasedan[®]) 3mg/kg por via Intramuscular, seguido de 300mg de cloreto de potássio (Cloreto de Potássio 10%) por via intravenosa na veia marginal da orelha.

Após a morte dos animais foram realizadas a dissecação (Figura 8) e ostectomia com broca trefina (Neodent[®]) de 10 mm de diâmetro, englobando os enxertos e as áreas receptoras.

²² DMC Equipamentos Ltda., São Carlos, SP, Brasil

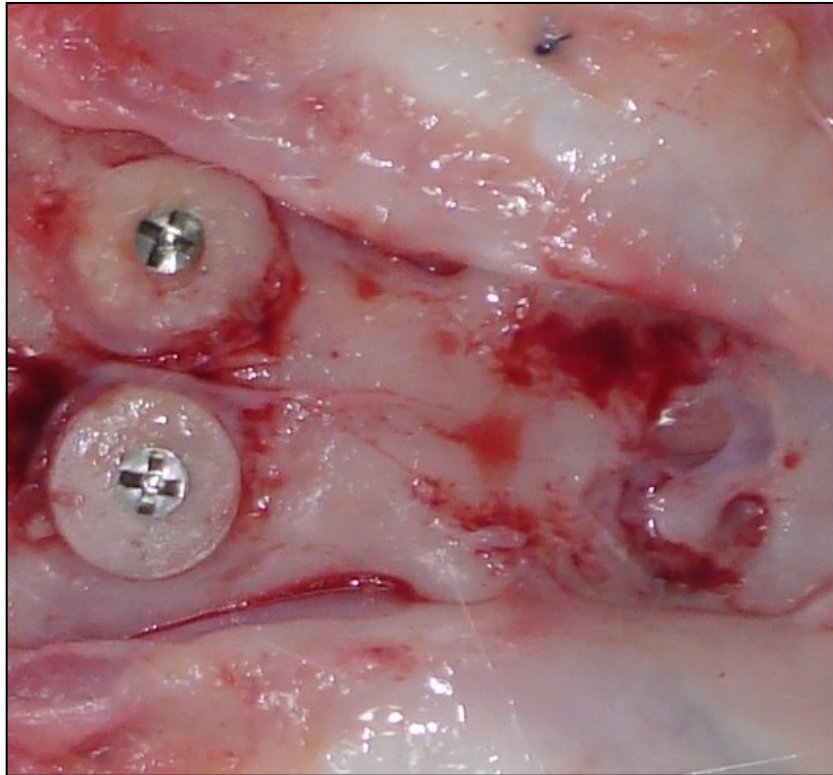


Figura 8 - Dissecção realizada para a ostectomia e remoção das amostras.

4.9 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

As amostras foram colocados em frascos previamente preparados e etiquetados, contendo solução de formalina tamponada a 10% por um período de 48 horas de fixação.

No Laboratório de Histologia da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) as peças foram submetidas à descalcificação por solução de ácido nítrico aquoso a 5%. Após essa etapa foi realizado um corte manual, com lâmina de micrótomo, na porção central no sentido longitudinal da amostra, dividindo a mesma em duas partes iguais.

Os cortes realizados para a análise com Microscopia Óptica (MO) foram realizados com micrótomo no sentido longitudinal com espessura de 5 μ m. As lâminas histológicas foram coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H&E).

A outra metade da amostra foi processada para microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Centro de Microscopia e Microanálises (CEMM) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS) da seguinte forma: foram fixadas no porta-espécime com

auxílio de fita de carbono. A seguir, as amostras foram metalizadas por evaporação de ouro e posicionadas em câmara a vácuo para observação em microscópio eletrônico de varredura.

4.10 ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR MO E MEV

Análise dos enxertos por Microscopia Óptica (MO)

Quanto à avaliação dos efeitos da laserterapia nos tecidos ósseos utilizamos a Microscopia Óptica (MO) com aumento de 40 X e 100 X. O microscópio óptico utilizado foi Olympus^{®23} CX31RTSF, e a câmera utilizada para as fotos de microscopia óptica da marca Olympus[®] modelo DP 2 TWAIN e o programa de imagens DP2-BSN Olympus Soft Imaging Solutions^{®24}.

A análise foi por histologia descritiva e semi-quantitativa adaptado das pesquisas de Weber et al. (2006), Torres et al. (2008) e Pinheiro et al. (2009) descritas anteriormente.

Quadro 2 - Critérios semi-quantitativos utilizados para análise de microscopia óptica.

	Deposição fibras colágenas	Remodelação óssea	Preenchimento das lacunas osteocíticas	Incorporação do enxerto na interface	Infiltrado inflamatório
Não	0	0	0	0	0
Leve	+	+	+	+	+
Moderado	++	++	++	++	++
Acentuado	+++	+++	+++	+++	+++

No tópico analisado denominado **deposição de fibras colágenas** os critérios semi-quantitativos utilizados foram:

Não – sem presença de fibras colágenas.

Leve – presença de menos de 25% de deposição de fibras colágenas.

Moderado – presença de 25% a 50% de deposição de fibras colágenas.

Acentuado – presença de mais de 50% de deposição de fibras colágenas.

²³ Olympus Corporation, Philippines

²⁴ Olympus Corporation, Münster, Germany

No tópico analisado denominado **remodelação óssea** ((processo fisiológico de reabsorção óssea pelos osteoclastos e deposição de novo osso pelos osteoblastos) os critérios semi-quantitativos utilizados foram:

Não – sem remodelação óssea.

Leve – presença de menos de 25% de remodelação óssea.

Moderado – presença de 25% a 50% de remodelação óssea.

Acentuado – presença de mais de 50% de remodelação óssea.

No tópico analisado denominado **preenchimento das lacunas osteocíticas** os critérios semi-quantitativos utilizados foram:

Não – sem preenchimento das lacunas osteocíticas.

Leve – presença de menos de 25% de preenchimento das lacunas osteocíticas.

Moderado – presença de 25% a 50% de preenchimento das lacunas osteocíticas.

Acentuado – presença de mais de 50% de preenchimento das lacunas osteocíticas.

No tópico analisado denominado **incorporação do enxerto na interface** (entre o enxerto e a área receptora) os critérios semi-quantitativos utilizados foram:

Não – sem incorporação do enxerto na interface.

Leve – presença de menos de 25% de incorporação do enxerto na interface.

Moderado – presença de 25% a 50% de incorporação do enxerto na interface.

Acentuado – presença de mais de 50% de incorporação do enxerto na interface.

No tópico analisado denominado **infiltrado inflamatório** os critérios semi-quantitativos utilizados foram:

Não – sem infiltrado inflamatório.

Leve – presença de menos de 25% de infiltrado inflamatório.

Moderado – presença de 25% a 50% de infiltrado inflamatório.

Acentuado – presença de mais de 50% de infiltrado inflamatório.

Os animais e as lâminas receberam números que identificavam através de uma planilha quais receberam ou não a irradiação a laser e os períodos de tempo de cicatrização (que não eram de conhecimento do pesquisador patologista que realizou análise histológica e de MEV).

A análise foi realizada por um patologista experiente com calibração prévia e cada score foi checado três vezes para confirmar a consistência da graduação aferida a cada amostra. A lâmina foi avaliada em toda a sua extensão com aumentos de 40X e 100X.

Análise da interface enxerto-área receptora por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) utilizado foi da marca Philips^{®25} modelo XL30 com resolução de 3,5 nm (no modo elétron secundário) e tensão de aceleração de 200V a 30kV.

A análise descritiva morfológica foi pelo método visual da interface entre o enxerto e a área receptora num corte longitudinal no centro de cada amostra com um aumento de 45 vezes e 500 vezes.

²⁵ Philips Company



Resultados

5 RESULTADOS

Os animais apresentaram o pós-operatório e o período de cicatrização sem complicações ou intercorrências. Nos períodos de morte para a retirada das amostras (com 35 e 70 dias) foram analisadas clinicamente as áreas dos enxertos e não apresentavam sinais de infecção ou rejeição.

5.1 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DESCRITIVA E SEMI-QUANTITATIVA POR MICROSCOPIA ÓPTICA

A avaliação histológica revelou alterações, principalmente com relação ao preenchimento das lacunas osteocíticas, desaparecimento do tecido mielóide do osso enxertado com substituição por tecido fibrocolagenoso, reação inflamatória, remodelação óssea e neovascularização. Essas alterações tiveram variações conforme o grupo experimental. Em todos os grupos, na região de interface entre o enxerto e a área receptora ocorreu incorporação.

Grupo de aloenxerto ósseo com 35 dias com laserterapia (L alo 35 - Figura 9A) e grupo controle (C alo 35 – Figura 9B). (Quadro 3).

No grupo com a laserterapia e controle ocorreu deposição de fibras colágenas de forma moderada em todo o espaço medular. Remodelação óssea foi visualizada de forma leve a moderada para o grupo com laserterapia e ocorreu de forma leve no grupo controle. As lacunas osteocíticas, tanto nos grupos laser como nos grupos controle, estavam preenchidas em sua maioria na interface entre a área receptora e o enxerto, enquanto que na superfície, no centro e na periferia das trabéculas ósseas a maioria das lacunas estavam vazias. Infiltrado de células mononucleares foram vistos nos espaços medulares, sendo de intensidade leve no grupo irradiado e variando de leve a acentuada no grupo controle.

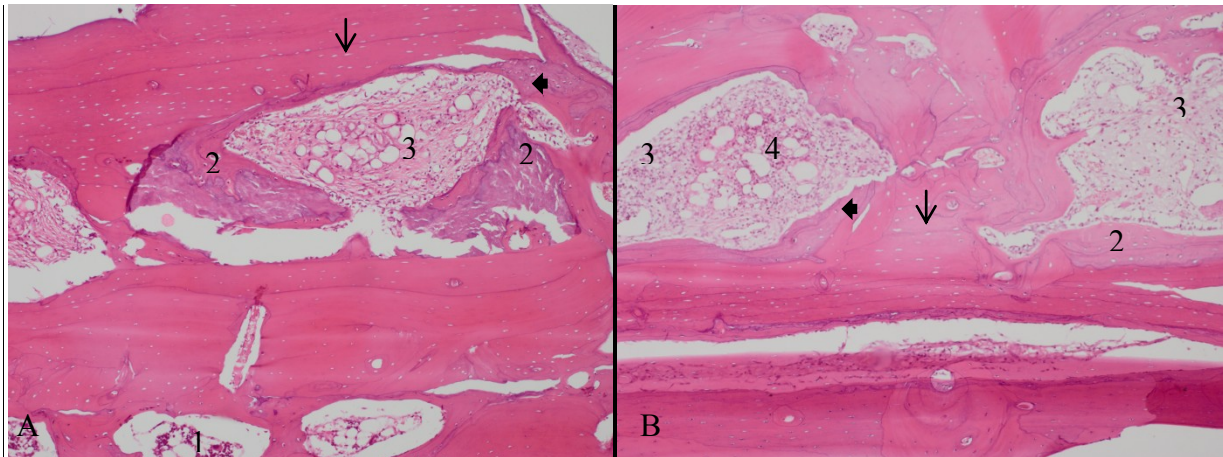


Figura 9 - A – Aloenxerto ósseo com 35 dias com laserterapia. B – Aloenxerto ósseo com 35 dias, grupo controle.

1-Osso receptor, Medula óssea normal. 2- Remodelação óssea. 3 – Proliferação de fibras colágenas. 4 – Infiltrado inflamatório. Seta – Lacunas ósseas vazias. Cabeça de seta – Lacunas ósseas preenchidas. H&E objetiva 10X.

Grupo de aloenxerto ósseo com 70 dias com laserterapia (L alo 70 – figura 10A) e grupo controle (C alo 70 – figura 10B). (Quadro 4).

As fibras colágenas estavam presentes em quantidade moderada a acentuada nos espaços medulares do grupo irradiado e de leve a moderada no grupo controle. Remodelação óssea foi observada de forma moderada no grupo com laserterapia e leve no grupo controle. As lacunas ósseas da interface e da superfície do osso irradiado com laserterapia estavam em sua maioria preenchidas por osteócitos, enquanto que na região central este preenchimento era visto de forma moderada. Para o grupo controle a maioria das lacunas estavam vazias no centro e na periferia, o preenchimento parcial ocorreu na interface entre o enxerto e a área receptora. Leve infiltrado de macrófagos foi observado nos dois grupos.

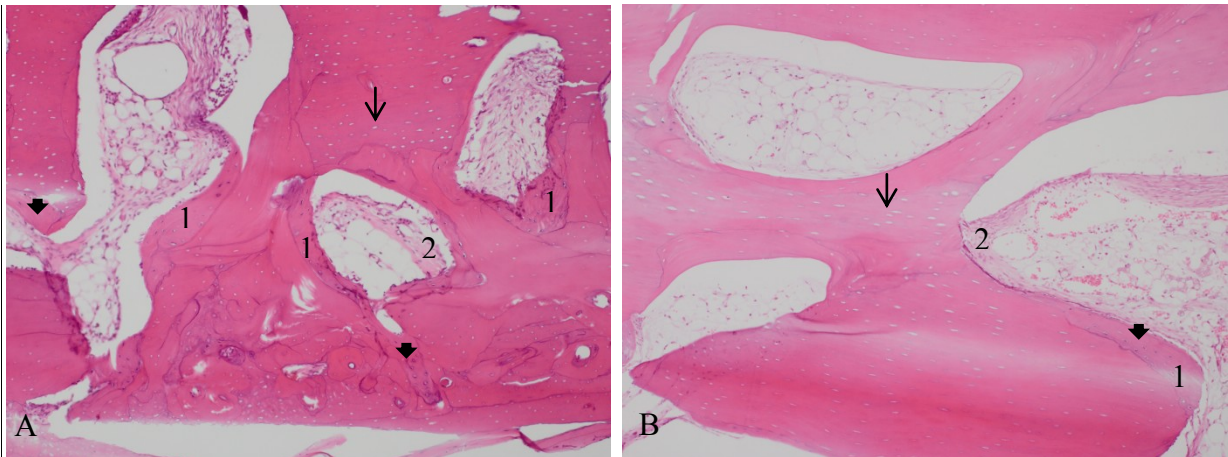


Figura 10 - A - Aloenxerto ósseo com 70 dias com laserterapia. B - Aloenxerto ósseo com 70 dias, grupo controle.

1- Remodelação óssea. 2 – Proliferação de fibras colágenas. Seta – Lacunas ósseas vazias. Cabeça de seta – Lacunas ósseas preenchidas. H&E objetiva 10X.

Grupo de autoenxerto ósseo com 35 dias com laserterapia (L auto 35 – Figura 11A) e grupo controle (C auto 35 – Figura 11B). (Quadro 5).

Para os dois grupos a deposição de fibras colágenas variou de leve a moderada intensidade. Ocorreu remodelação óssea de intensidade moderada a acentuada no grupo irradiado e leve a moderada no grupo controle. A maioria das lacunas do grupo irradiado estavam preenchidas por osteócitos enquanto que no grupo controle estavam preenchidas na interface e na superfície, sendo que no centro a maioria estavam vazias. Infiltrado de macrófagos foram observados de forma leve a moderada nos dois grupos.

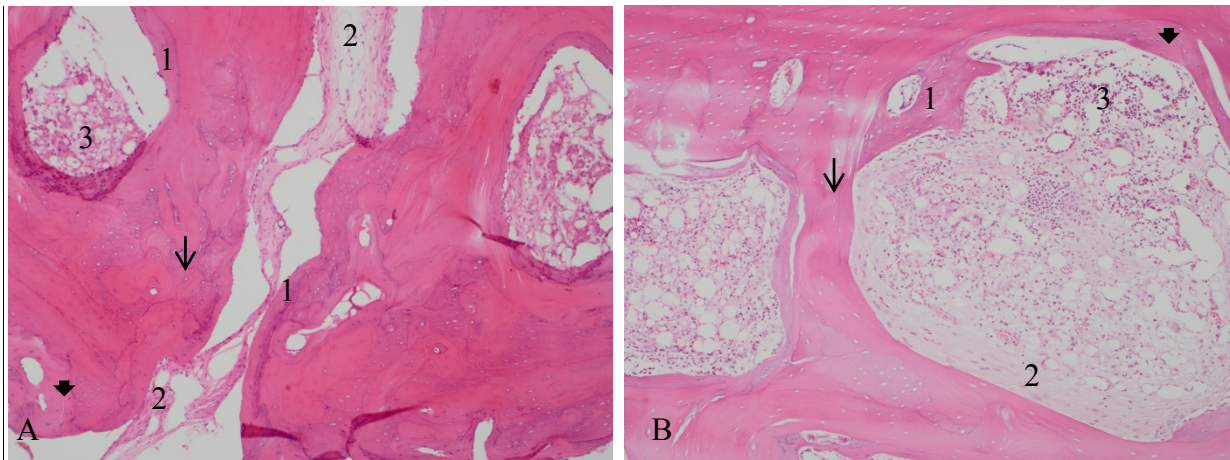


Figura 11 - A - Autoenxerto ósseo com 35 dias com laserterapia. B - Autoenxerto ósseo com 35 dias, grupo controle.

1- Remodelação óssea. 2 – Proliferação de fibras colágenas. 3 – Infiltrado inflamatório. Seta – Lacunas ósseas vazias. Cabeça de seta – Lacunas ósseas preenchidas. H&E objetiva 10X.

Grupo de autoenxerto ósseo com 70 dias com laserterapia (L auto 70 – Figura 12A) e grupo controle (C auto 70 – Figura 12B). (Quadro 6).

No grupo irradiado e controle a deposição de fibras colágenas foi de intensidade leve. A remodelação óssea estava presente de forma moderada a acentuada no grupo irradiado e no grupo controle de forma moderada. As lacunas osteocíticas nos enxertos irradiados estavam preenchidas em sua maioria, e as lacunas do grupo controle estavam preenchidas na interface e na superfície e em menor grau na região central. Ausência de infiltrado inflamatório nos dois grupos.

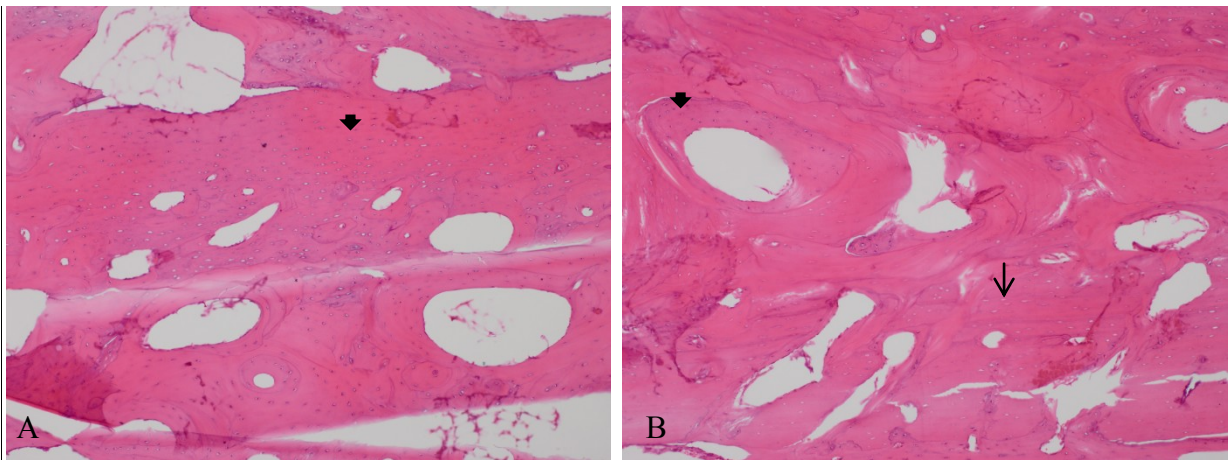


Figura 12 - A - Autoenxerto ósseo com 70 dias com laserterapia. B - Autoenxerto ósseo com 70 dias, grupo controle.

Tecido ósseo com aspecto histomorfológico normal, com a maioria das lacunas osteocíticas preenchidas. Seta – Lacunas ósseas vazias. Cabeça de seta – Lacunas ósseas preenchidas. H&E objetiva 10X.
H&E objetiva 10X.

Representação semi-quantitativa das alterações histológicas encontradas na análise da incorporação de enxertos ósseos em bloco irradiado com laser de baixa potência – Estudo em coelhos.

Quadro 3 - Grupo de aloenxerto ósseo com 35 dias grupo controle (C alo 35) e com laserterapia (L alo 35).

	Deposição fibras colágenas	Remodelação óssea	Preenchimento das lacunas osteocíticas	Incorporação do enxerto na interface	Infiltrado inflamatório
1- C1 aloenxerto 35 d	+	+	+	+++	++
2- C2 aloenxerto 35 d	++	+	+	+++	+
3- C3 aloenxerto 35 d	+	+	++	+++	+++
4- L1 aloenxerto 35 d	++	+	+	+++	+
5- L2 aloenxerto 35 d	++	++	++	+++	+
6- L3 aloenxerto 35 d	++	++	+	+++	+

Quadro 4 - Grupo de aloenxerto ósseo com 70 dias grupo controle (C alo 70) e com laserterapia (L alo 70).

	Deposição fibras colágenas	Remodelação óssea	Preenchimento das lacunas osteocíticas	Incorporação do enxerto na interface	Infiltrado inflamatório
7- C1 aloenxerto 70 d	++	+	+	+++	+
8- C2 aloenxerto 70 d	++	+	+	+++	+
9- C3 aloenxerto 70 d	++	+	+	+++	+
10- L1 aloenxerto 70 d	++	++	++	+++	+
11- L2 aloenxerto 70 d	++	++	++	+++	+
12- L3 aloenxerto 70 d	++	++	+	+++	+

Quadro 5 - Grupo de autoenxerto ósseo com 35 dias grupo controle (C auto 35) e com laserterapia (L auto 35).

	Deposição fibras colágenas	Remodelação óssea	Preenchimento das lacunas osteocíticas	Incorporação do enxerto na interface	Infiltrado inflamatório
13-C1 autoenxerto 35 d	++	++	++	+++	++
14-C2 autoenxerto 35 d	+	+	++	+++	+
15-C3 autoenxerto 35 d	+	++	++	+++	+
16-L1 autoenxerto 35 d	++	++	++	+++	++
17- L2 autoenxerto 35 d	+	++	+++	+++	+
18- L3 autoenxerto 35 d	++	++	+++	+++	+

Quadro 6 - Grupo de autoenxerto ósseo com 70 dias grupo controle (C auto 70) e com laserterapia (L auto 70).

	Deposição fibras colágenas	Remodelação óssea	Preenchimento das lacunas osteocíticas	Incorporação do enxerto na interface	Infiltrado inflamatório
19-C1 autoenxerto 70 d	+	++	++	+++	0
20-C2 autoenxerto 70 d	+	++	++	+++	0
21-C3 autoenxerto 70 d	+	++	++	+++	0
22-L1 autoenxerto 70 d	+	++	++	+++	0
23-L2 autoenxerto 70 d	+	+++	+++	+++	0
24-L3 autoenxerto 70 d	+	+++	+++	+++	0

5.2 AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DOS ENXERTOS NA INTERFACE ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E MICROSCOPIA ÓPTICA (MO)

Através da MEV observa-se com aumento de 45 X e 500 X (figuras: 13 A e C; 14 A e C; 15 A e C; 16 A e C; 17 A e C; 18 A e C; 19 A e C; 20 A e C) e da Microscopia Óptica aumento de 40 X (figuras: 13 B; 14 B; 15 B; 16 B; 17 B; 18 B; 19 B e 20 B) e 100 X (figuras: 9 A e B; 10 A e B; 11 A e B; 16 A e B) que ocorreu a incorporação dos enxertos na interface com a área receptora em todas as amostras do experimento. Nas áreas de osso compacto, o enxerto apresentava-se em íntimo contato com a área receptora, com preenchimento das lacunas osteocíticas, e nos espaços medulares da interface ocorreram degeneração e necrose da medula e neovascularização, com deposição de fibras colágenas e remodelação óssea.

A análise demonstrou a propriedade osteocondutiva dos blocos de aloenxertos ósseos processados por congelamento profundo, que preservou suas características estruturais, e a matriz óssea, servindo como arcabouço para a migração de vasos sanguíneos e células a partir do hospedeiro para o enxerto.

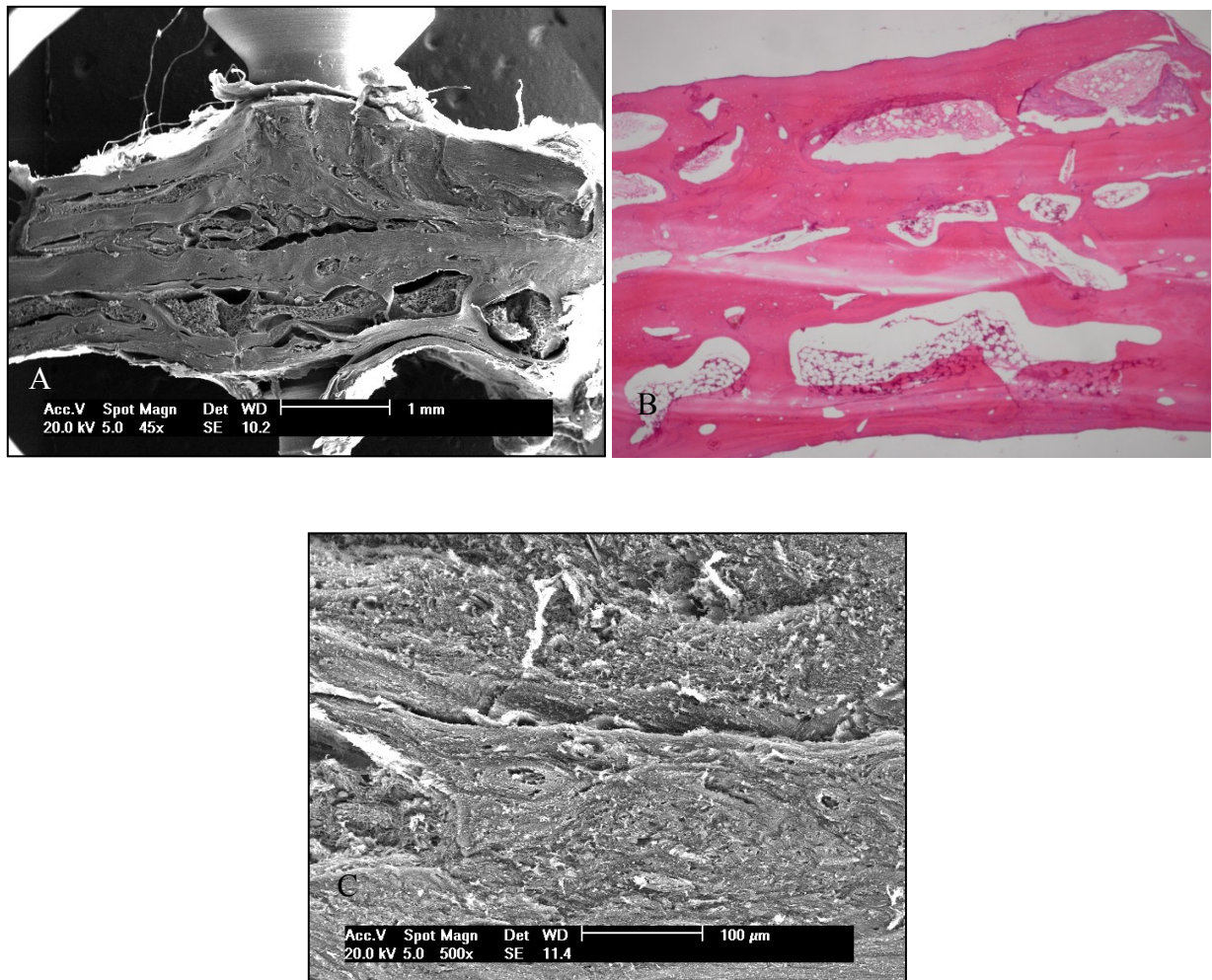


Figura 13 - A - Microscopia Eletrônica de varredura 45 X. B - H&E objetiva 4 X. C - Microscopia Eletrônica de varredura 500 X. Grupo de aloenxerto ósseo com 35 dias com laserterapia (L alo 35).

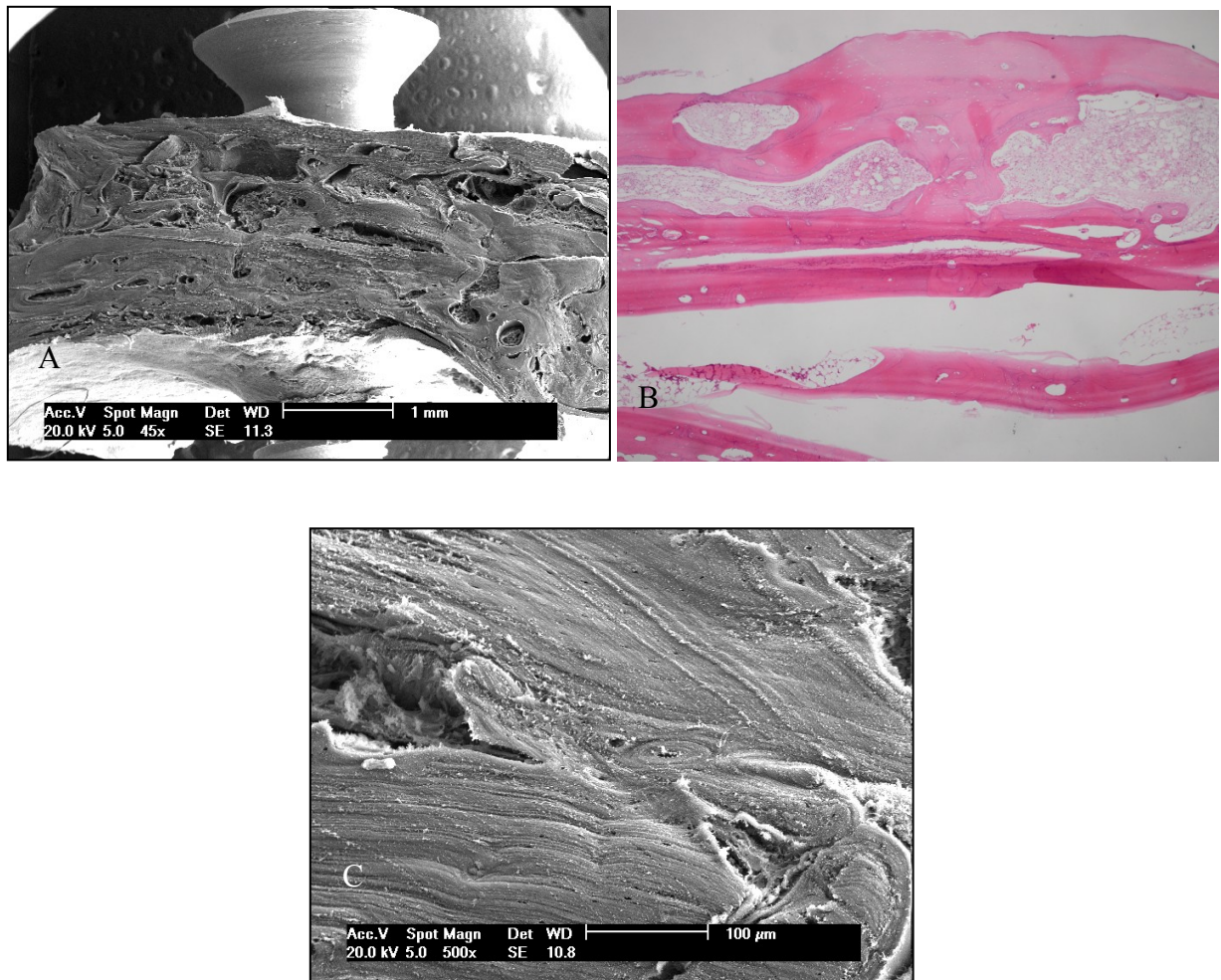


Figura 14 - A - Microscopia Eletrônica de varredura 45 X. B - H&E objetiva 4 X. C - Microscopia Eletrônica de varredura 500 X. Grupo de aloenxerto ósseo com 35 dias Controle (C alo 35).

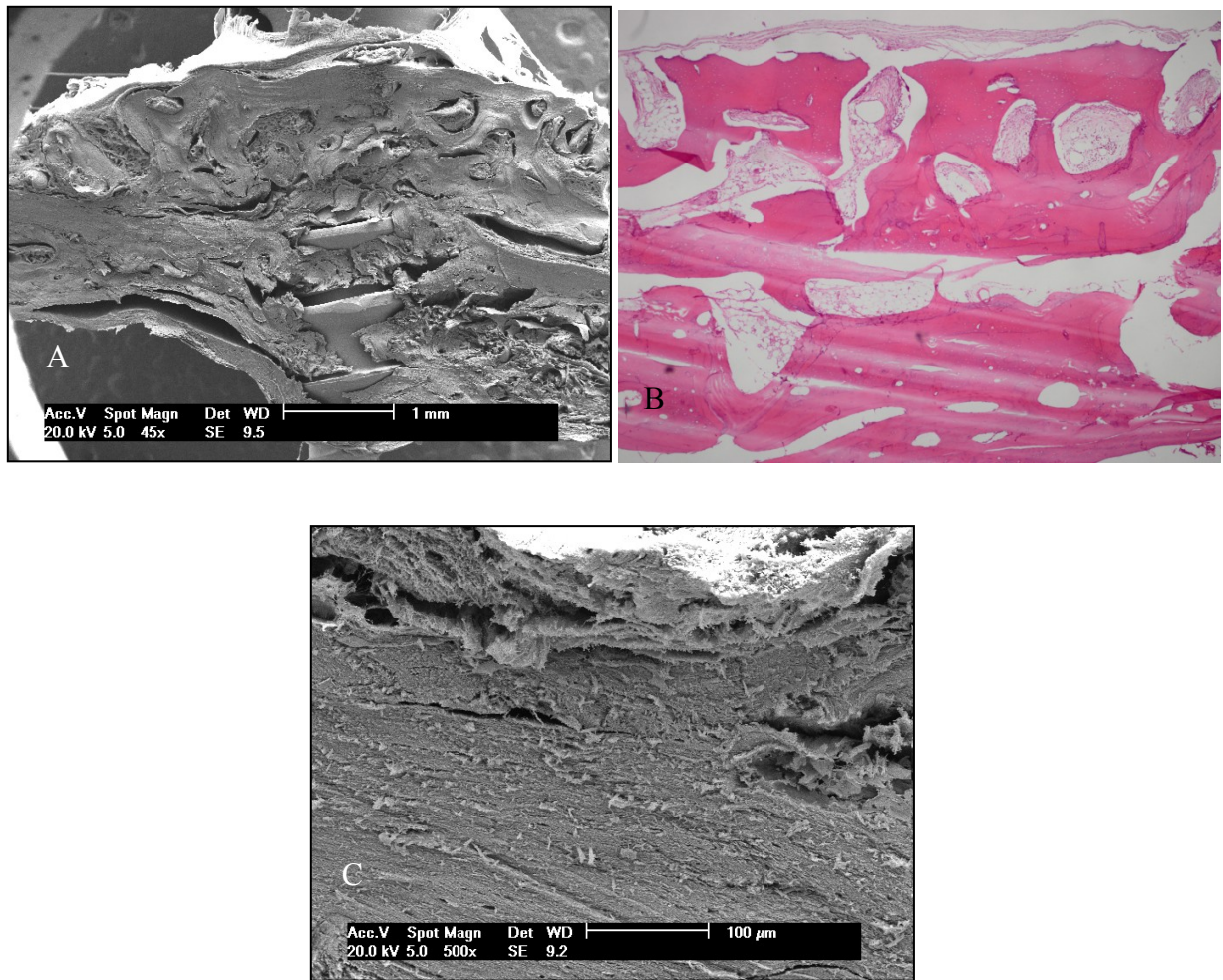


Figura 15 - A - Microscopia Eletrônica de varredura 45 X. B - H&E objetiva 4 X. C - Microscopia Eletrônica de varredura 500 X. Grupo de aloenxerto ósseo com 70 dias com laserterapia (L alo 70).

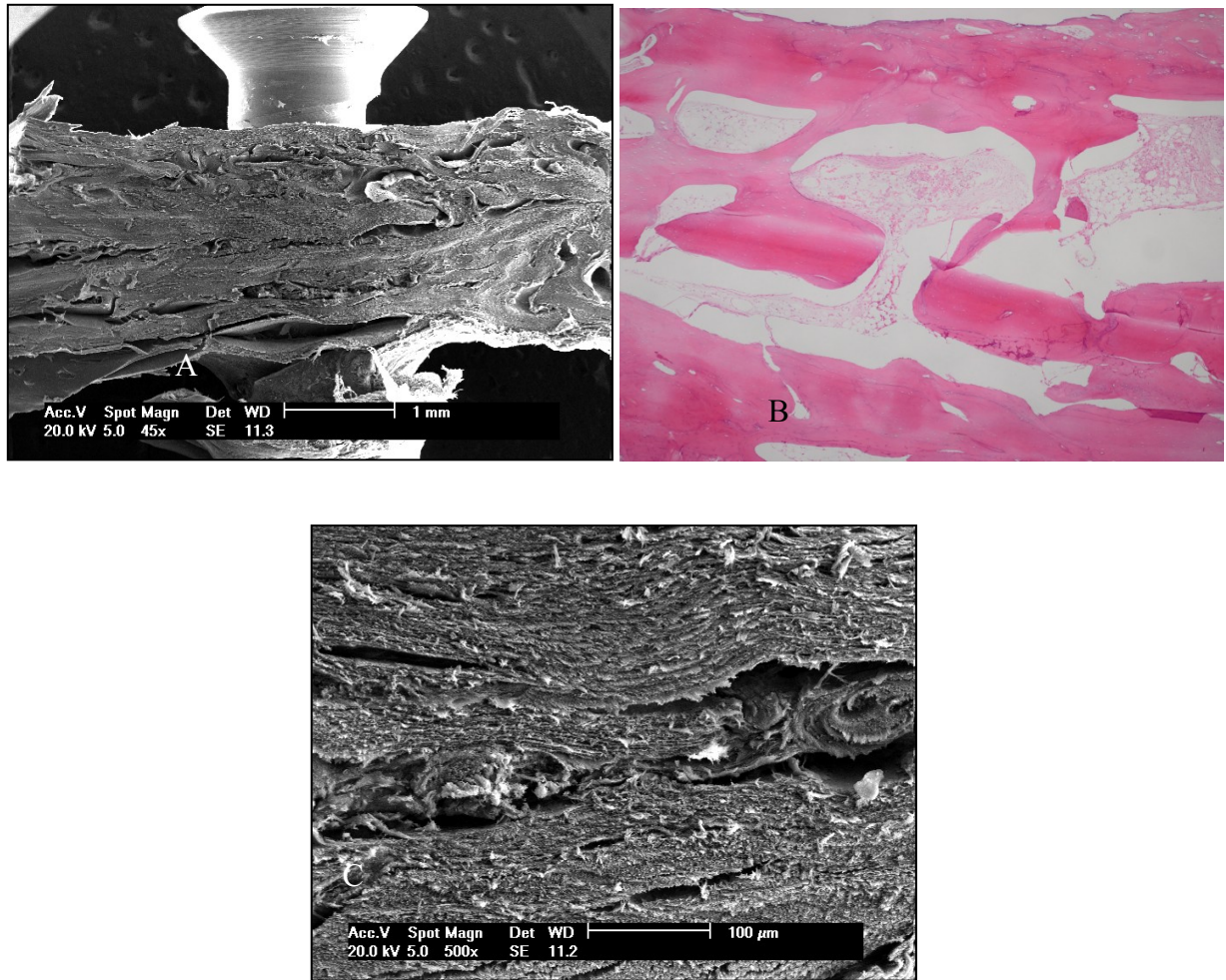


Figura 16 - A - Microscopia Eletrônica de varredura 45 X. B - H&E objetiva 4 X. C - Microscopia Eletrônica de varredura 500 X. Grupo de aloenxerto ósseo com 70 dias Controle (C alo 70).

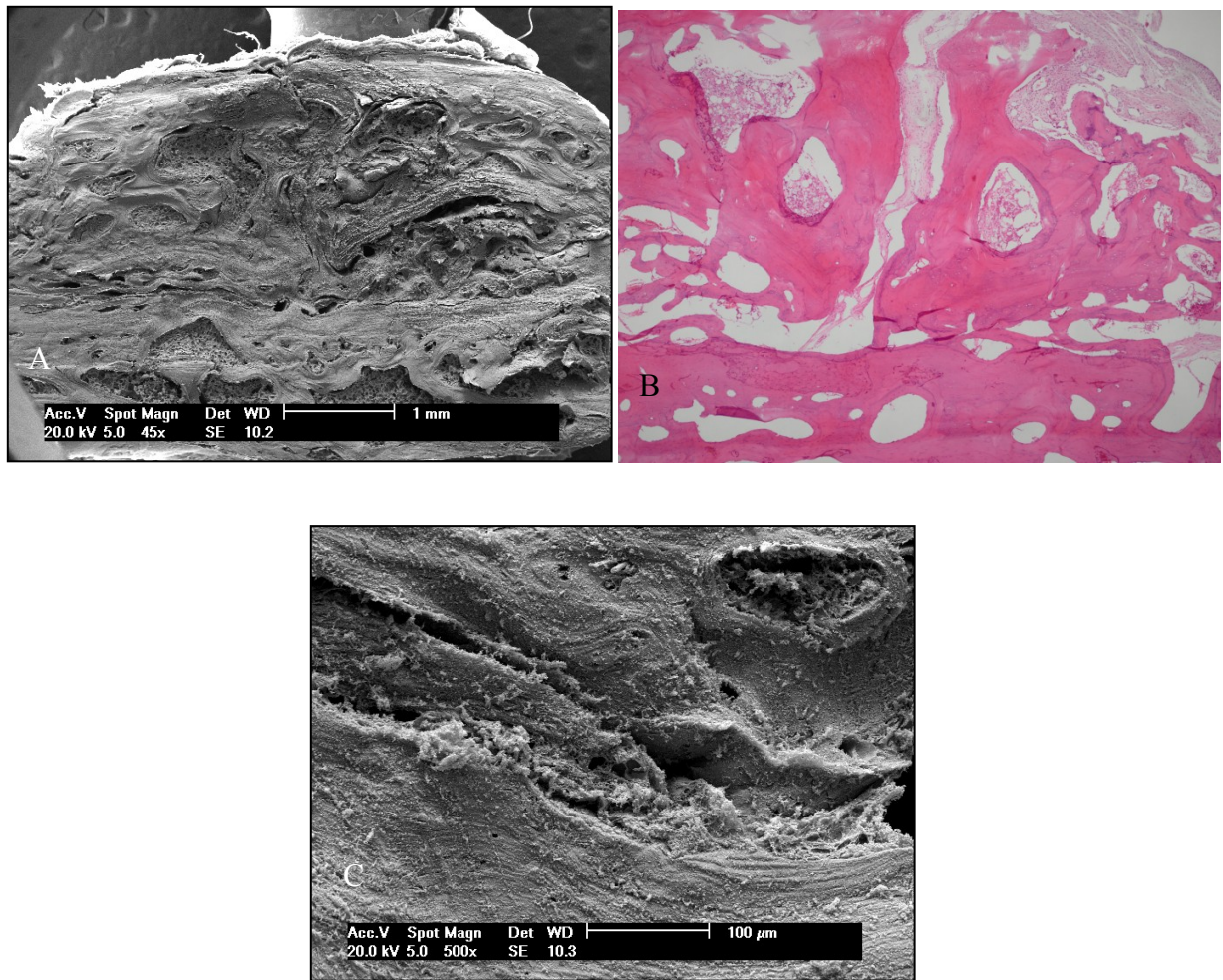


Figura 17 - A - Microscopia Eletrônica de varredura 45 X. B - H&E objetiva 4 X. C - Microscopia Eletrônica de varredura 500 X. Grupo de autoenxerto ósseo com 35 dias com laserterapia (L auto 35).

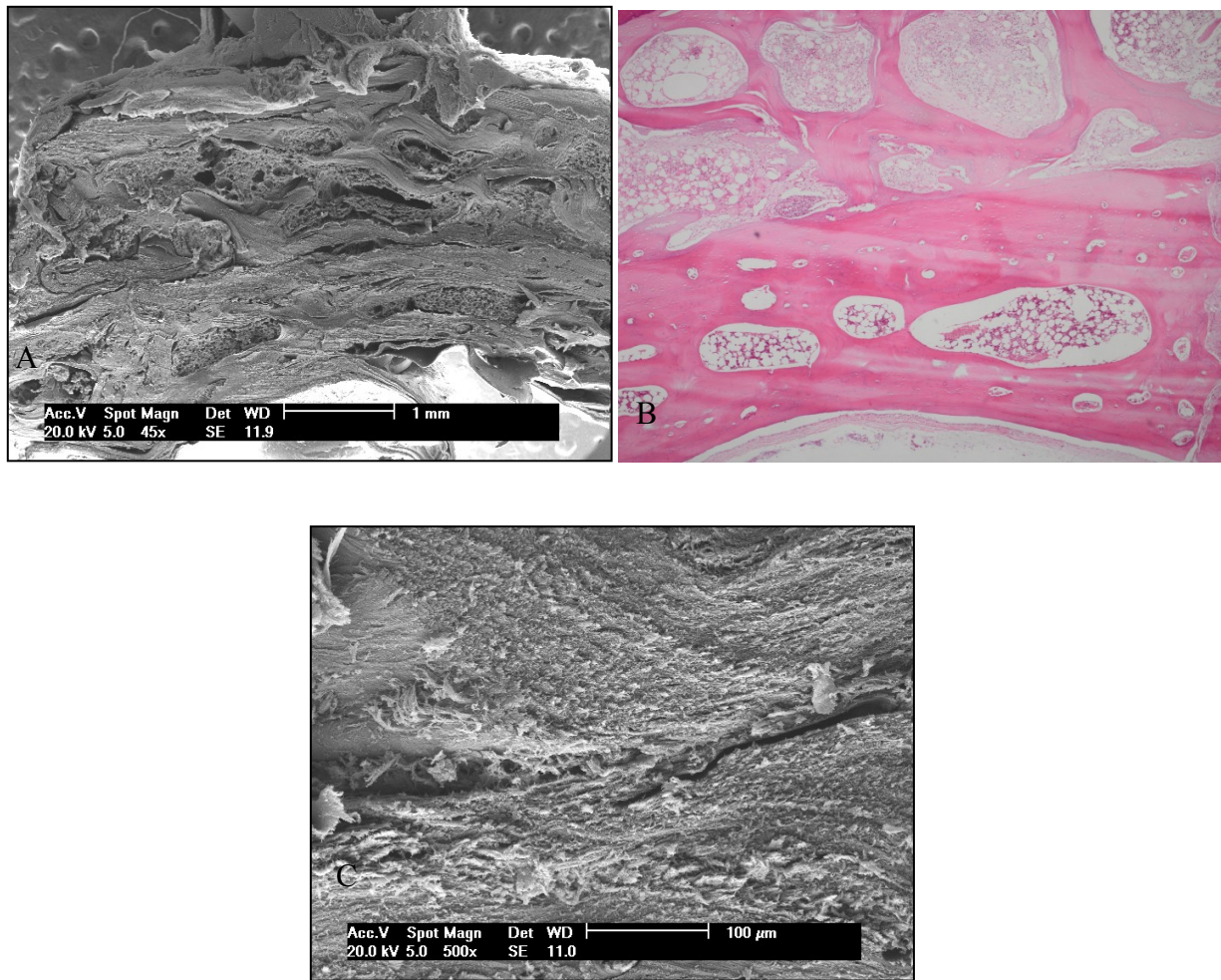


Figura 18 - A - Microscopia Eletrônica de varredura 45 X. B - H&E objetiva 4 X. C - Microscopia Eletrônica de varredura 500 X. Grupo de autoenxerto ósseo com 35 dias Controle (C auto 35).

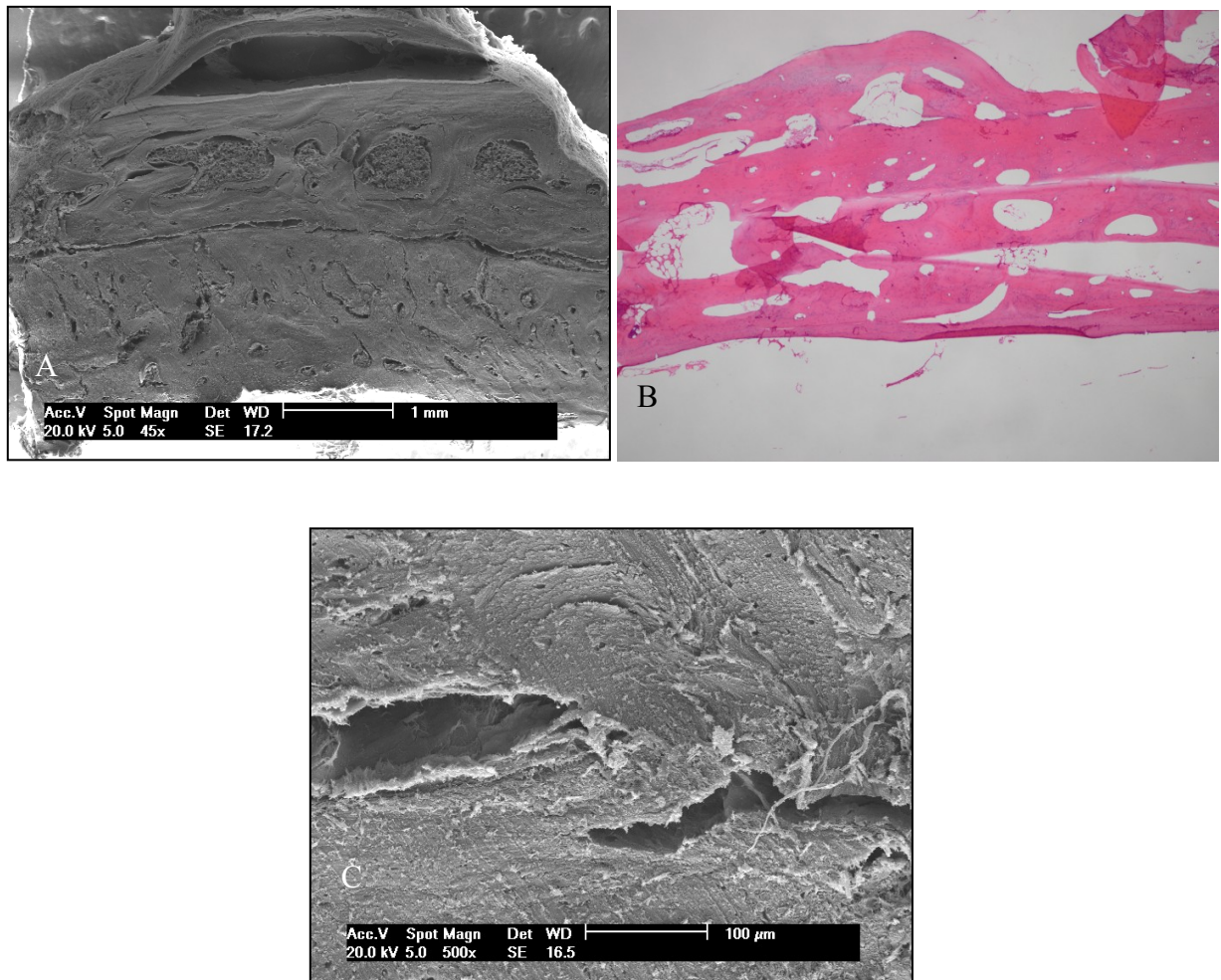


Figura 19 - A - Microscopia Eletrônica de varredura 45 X. B - H&E objetiva 4 X. C - Microscopia Eletrônica de varredura 500 X. Grupo de autoenxerto ósseo com 70 dias com laserterapia (L auto 70).

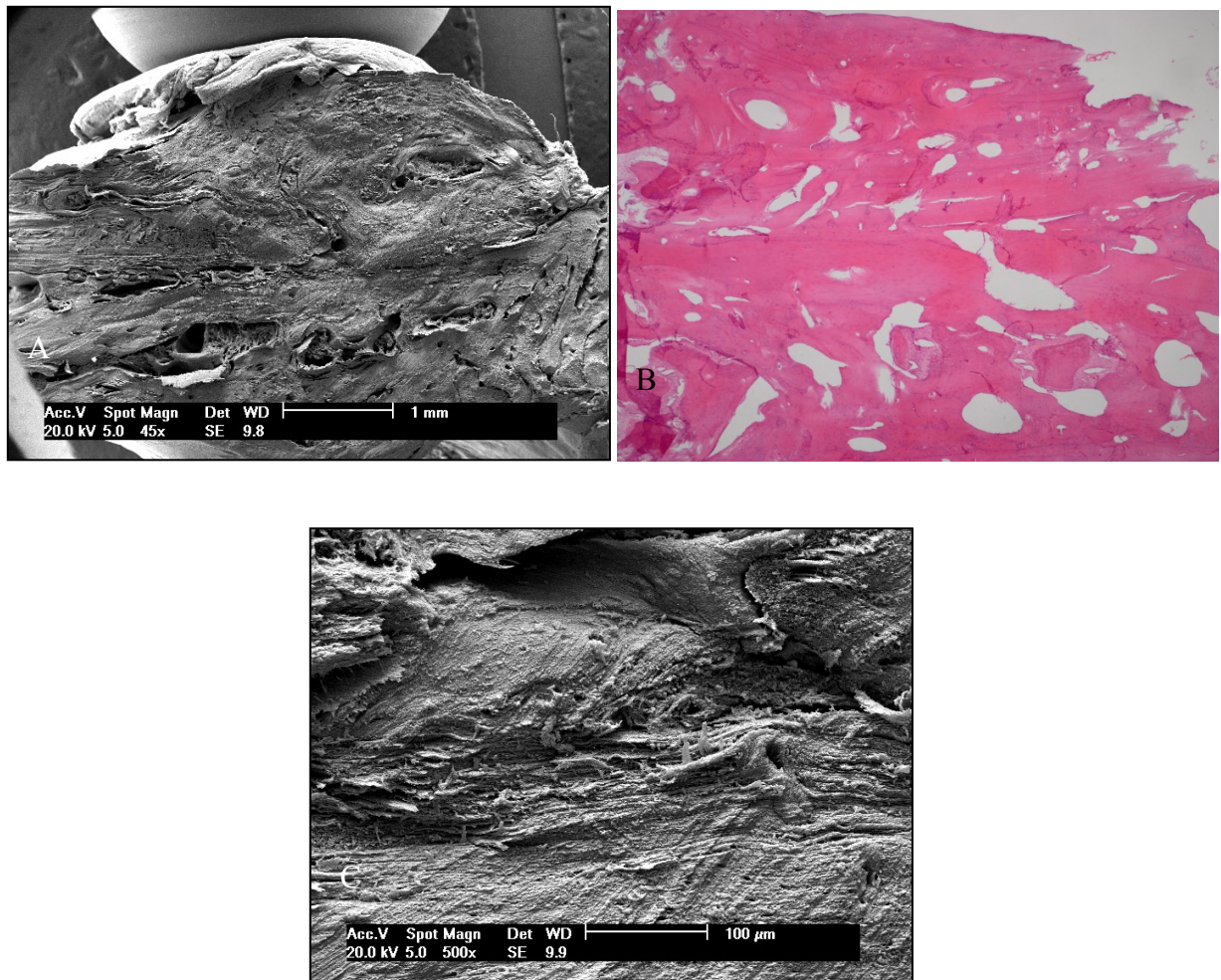


Figura 20 - A - Microscopia Eletrônica de varredura 45 X. B - H&E objetiva 4 X. C - Microscopia Eletrônica de varredura 500 X. Grupo de autoenxerto ósseo com 70 dias Controle (C auto 70).



Discussão

6 DISCUSSÃO

Esta pesquisa utilizou o modelo animal - coelho, assim como os trabalhos de Khadra et al. (2004) e Campanha et al. (2010), devido à necessidade de uma área de superfície óssea mais ampla para avaliar o efeito da laserterapia em blocos ósseos de maior diâmetro, à facilidade de manuseio, e a disponibilidade no biotério da UDESC. Para a retirada e a implantação dos blocos de autoenxerto e a implantação de blocos de aloenxertos foram necessário três áreas de 8 mm de diâmetro no mesmo animal, sendo utilizada a calvária por ter uma superfície maior que regiões como o fêmur e a tíbia, em que a maioria dos trabalhos com laserterapia na regeneração óssea utiliza para realizar defeitos ósseos com pequenos diâmetros de 1 a 5 mm (NICOLAU et al. 2003; PINHEIRO et al., 2003; ROCHKIND et al., 2004; GERBI et al., 2005; MERLI et al., 2005; WEBER et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2006; TORRES et al., 2008; PINHEIRO et al., 2009).

Para se evitar o efeito sistêmico do laser utilizaram-se grupos de animais para controle diferentes dos animais em que foi realizada a laserterapia, assim como a maioria das pesquisas. Nicolau et al. (2003), Khadra et al. (2004), e Weber et al. (2006) relatam que os efeitos sistêmicos da laserterapia não podem ser descartados, assim alguns estudos falharam em revelar efeitos significantes da irradiação quando comparados com controles contralaterais no mesmo animal. Jakse et al. (2007) não confirmaram o efeito positivo da laserterapia no enxerto ósseo autógeno, porém o estudo apresenta um viés, a irradiação foi aplicada no mesmo animal do grupo controle, portanto os enxertos do seios maxilares podem ter resultados semelhantes devido ao efeito sistêmico da laserterapia.

Quanto ao comprimento de onda e o tipo de laser empregado, a literatura pesquisada é bem diversificada. Alguns autores utilizam em suas pesquisas laser com comprimento de onda de 680-690 nm sem relatar o tipo de laser (DÖRTBUDAK et al., 2000; DÖRTBUDAK et al., 2002; JAKSE et al., 2007). A maioria dos artigos pesquisados utilizou laser de Arseneto de Gálio-Alumínio (AsGaAl) com comprimento de onda de 830 nm (SILVA Jr. et al., 2002; PINHEIRO et al., 2003; KHADRA et al., 2004; GERBI et al., 2005; WEBER et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2006; CERQUEIRA et al., 2007; ABOELSAAD et al., 2009; PINHEIRO et al., 2009; CAMPANHA et al., 2010) ou AsGaAl com comprimento de onda de 790 nm (TORRES et al., 2008), AsGaAl com λ 670 nm (MERLI et al., 2005), AsGaAl λ 660 nm (NICOLAU et al., 2003) e também com laser de HeNe com comprimento de onda de 632,8 nm (ROCHKIND et al., 2004;

STEIN et al., 2005). Esta pesquisa utilizou o laser de Arseneto de Gálio-Alumínio (AsGaAl) com comprimento de onda de 830 nm, como a maioria da literatura pesquisada, devido ao bloco de enxerto ósseo ser espesso e compacto e a luz laser infravermelha penetrar profundamente nos tecidos (SILVA Jr. et al., 2002), que pode ser de 2 a 3 cm de penetração (KHADRA et al. 2004) especialmente em tecidos subcutâneos (WEBER et al., 2006).

Os períodos de dias de cicatrização óssea foram bastante variados nos estudos com laserterapia pesquisados em animais. Em ratos este período variou de 7 a 40 dias, em ovelhas de 35 a 112 dias, e em coelhos de 15 a 56 dias. Neste experimento com o modelo animal coelho foi avaliada a incorporação dos enxertos ósseos em dois períodos distintos de 35 e 70 dias. Campanha et al. (2004) afirmam que a cicatrização óssea em coelhos ocorre três vezes mais rápida que a cicatrização óssea em humanos. Nestes períodos de 35 dias (5 semanas) e 70 dias (10 semanas), extrapolando para humanos equivalem a cicatrização óssea de aproximadamente 15 semanas (3 a 4 meses) e 30 semanas (7 a 8 meses).

Em relação ao número de aplicações os artigos pesquisados relatam de uma a 14 aplicações de laserterapia. Nesta pesquisa realizaram-se oito aplicações sendo uma no pós-operatório imediato e mais sete a cada 48 horas, semelhante aos trabalhos de Pinheiro et al. (2003), Gerbi et al. (2005), Weber et al. (2006), Guimarães et al. (2006) e Torres et al. (2008). Outras pesquisas que realizaram sete aplicações de laserterapia foram Pinheiro et al. (2009) e Campanha et al. (2010), todas demonstrando os efeitos positivos da biomodulação com a laserterapia. Múltiplas irradiações são mais efetivas que uma simples dose, como um fator de formação óssea e crescimento de fibroblastos (MERLI et al. 2005).

Esta pesquisa utilizou o processamento do osso alógeno por congelamento profundo, que demonstrou ser uma técnica adequada de tratamento para aloenxertos. O bloco alógeno apresentou capacidade osteocondutiva e manutenção estrutural como arcabouço para a proliferação de vasos sanguíneos e células, ocorrendo o preenchimento parcial das lacunas osteocíticas, início de remodelação óssea, incorporação na interface com o hospedeiro. Não ocorreram processos infecciosos ou de rejeição dos enxertos na análise clínica. A maioria dos Bancos de Tecidos Músculo-Esqueléticos do Brasil utilizam principalmente o processamento de tecido ósseo por congelamento profundo, e em menor quantidade por liofilização. Estes processamentos são associados a testes sorológicos dos doadores, entrevistas com os familiares, descarte de material que produza cultura bacteriológica positiva, e manipulação do enxerto sob

condições assépticas. Os processamentos excessivos do osso alógeno podem levar a problemas nas propriedades mecânicas, na osteocondução e na osteoindução. O congelamento profundo atua reduzindo a água livre a níveis críticos possibilitando a conservação das propriedades estruturais e de osteocondução do osso, além de preservar parcialmente as BMPs que podem estimular na osteoindução das células do receptor. Ocorre necrose dos osteócitos deixando as lacunas osteocíticas vazias e possibilitando a redução da reação imunológica. A maioria dos estudos pesquisados não demonstrou reações imunológicas importantes como o processamento por congelamento profundo. A associação de outros métodos como liofilização, desmineralização, irradiação gama, óxido de etileno, e o uso de peróxido de hidrogênio podem comprometer as propriedades estruturais que são importantes nestes enxertos em bloco aposicionais (NATHER, 2003; BAPTISTA et al., 2003; DELLOYE et al., 2003; DEPAULA et al., 2005; GALEA e KEARNEY, 2005; BOSTROM e SEIGERMAN, 2005; HOFMANN et al., 2005; ASLAN et al., 2006; BAUER, 2007; ANDRADE et al., 2008). Esta pesquisa confirmou o trabalho de ANDRADE et al. (2008), realizado com blocos ósseos de coelhos que foram processados por congelamento profundo a -70°C por 30 dias, mantendo as características estruturais do osso e não comprometendo sua morfologia. O processamento por congelamento profundo é um método que apresenta menor dificuldade para ser realizado, com menos equipamentos e menores custos quando comparado aos processamentos de liofilização e/ou desmineralização.

Observou-se um aumento da deposição de fibras colágenas nos blocos alógenos e autógenos irradiados com laserterapia de baixa potência quando comparados com os grupos não-irradiados. O aumento da atividade e da proliferação fibroblástica ocasionadas pelo efeito biomodulatório da laserterapia são responsáveis pela maior concentração de fibras colágenas (TORRES et al., 2008; PINHEIRO et al., 2009), concordando com o trabalho de Pinheiro et al. (2003).

Ocorreu uma predominância da remodelação óssea nos grupos irradiados com laser nos blocos alógenos aos 35 e aos 70 dias em relação ao grupo controle. Concordando com os autores que demonstram uma maior remodelação óssea nos grupos em que foi realizada a laserterapia (DÖRTBUDAK et al., 2000; PINHEIRO et al., 2003; NICOLAU et al., 2003; GERBI et al., 2005; MERLI et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2006; CERQUEIRA et al., 2007).

Foi observado maior preenchimento das lacunas osteocíticas nos grupos irradiados com laser principalmente aos 70 dias nos blocos alógenos e aos 35 dias e 70 dias nos blocos autógenos quando comparados aos respectivos grupos controles. Demonstrando vitalidade óssea parcial do aloenxerto e a característica osteocondutora do aloenxerto ósseo neste breve período do experimento. Os autores Dörtbudak et al. (2002) e Jakse et al. (2007) observaram um maior preenchimento das lacunas osteocíticas de enxertos autógenos nos grupos irradiados com laserterapia de baixa potência quando comparados aos grupos controles não irradiados.

Todos os grupos apresentaram incorporação na interface entre o leito receptor e o enxerto ósseo. As características da união do osso alógeno com a área receptora sugerem a aceitação pelo hospedeiro. Possíveis fatores para esta incorporação na interface provavelmente se devem: a adaptação adequada do formato da parte interna da calota craniana do bloco do enxerto com a região externa da calota craniana do coelho receptor, à estabilidade obtida pelo parafuso ancorado bicorticalmente, a intimidade dos blocos de enxerto com as células ósseas e a vascularização do leito receptor (DELLOYE et al., 2003; ARROTÉIA e PEREIRA, 2005; PINHEIRO e GERBI, 2006). Nather (2003) e Bauer (2007) relatam que a incorporação do aloenxerto com o hospedeiro ocorre primeiramente na interface entre o enxerto e a área receptora e abaixo do periósteo, corroborando com os resultados desta pesquisa. Como a maioria dos trabalhos sobre a incorporação óssea é da área de ortopedia, as amostras analisadas possuem tamanho e volume muito maiores dos utilizados na implantodontia, comumente alcançando vários centímetros (BURCHARDT et al., 1978; BAUER e MUSCHLER, 2000; NATHER, 2003). Nos rebordos alveolares, o aumento médio esperado é de 4 a 5 mm em espessura e 1 a 2 mm em altura (LEONETTI e KOUP, 2003; KEITH Jr. et al., 2006).

Carvalho et al. (2002), Silva Jr. et al. (2002) e Obradović et al. (2009) relataram que a irradiação com laserterapia de baixa potência absorvida pelos tecidos provoca efeitos indiretos antiinflamatório. No grupo de aloenxerto com laserterapia aos 35 dias observou-se uma biomodulação com um menor infiltrado inflamatório que no grupo controle. E relacionando o aloenxerto comparativamente ao autoenxerto o infiltrado inflamatório foi menor no autoenxerto, provavelmente devido ao autoenxerto não promover nenhuma reação imunológica ao hospedeiro, enquanto que no aloenxerto, mesmo com o congelamento profundo, existe a possibilidade de ocorrer reação imunológica mínima (BETZ, 2002; HAAS et al., 2002; BOSTROM e

SEIGERMAN, 2005; LONG Jr. et al., 2007; INODA et al., 2007; LEVANDOWSKI Jr. et al., 2008).

Esta pesquisa demonstrou que é necessário um período maior do que 70 dias em coelhos para a completa incorporação óssea de aloenxertos. Concordando com Norman-Taylor e Villar (1997) que relataram que os aloenxertos sofrem alterações biológicas que são qualitativamente similares aos autoenxertos, porém ocorrem mais lentamente, devido à maior reação inflamatória inicial, a possuir reabsorção e revascularização mais lentas, e não fornecer um conteúdo celular. Este atraso no período de incorporação deve ser levado em conta no momento da colocação de implantes osseointegrados (LEVANDOWSKI Jr. et al., 2008).

Os experimentos em animais são métodos usados para estimar a reação tecidual de materiais bioativos. Embora, os resultados obtidos de um modelo animal experimental não devem necessariamente ser extrapolados para os humanos (KHADRA et al., 2004).

Tendo como base esta pesquisa é possível futuramente analisar a significância de alterações no tempo de reparação, no protocolo cirúrgico e de processamento, como a perfuração dos blocos ósseos alógenos, a ativação da área receptora através da descorticalização e de perfurações, a imersão dos blocos ósseos em antibióticos antes do congelamento profundo, testes de tração dos blocos enxertados, testes de expressão de proteínas ósseas.



Conclusões

7 CONCLUSÕES

O aloenxerto ósseo processado por congelamento profundo associado à laserterapia de baixa potência apresentou incorporação na interface com o hospedeiro, remodelação óssea moderada, preenchimento parcial das lacunas osteocíticas, menor infiltrado inflamatório nos períodos iniciais e maior deposição de fibras colágenas que o grupo controle, no breve período desta análise.

O aloenxerto ósseo processado por congelamento profundo associado à laserterapia de baixa potência é adequado como uma alternativa para o tratamento de defeitos ósseos.

O processamento do osso alógeno pelo método de congelamento profundo mantém as características estruturais e viabiliza a osteocondução do tecido ósseo.



Referências

REFERÊNCIAS

ABOELSAAD NS, SOORY M, GADALLA LMA, RAGAB LI, DUNNE S, ZALATA KR, LOUCA C. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study). **Lasers Med Sci**, 24:387–395, 2009.

ACCETURI E, ERMANI KB, GOLDONI PR et al. Reconstrução de defeitos ósseos na maxila e mandíbula com osso humano congelado. **Rev Ciências Odontológicas**, 3(3):27-30, 2000.

ALLARD RH, LEKKAS C, SWART JG. Autologous versus homologous bone grafting in osteotomies, secondary cleft repairs and ridge augmentations: a clinical study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 64(3):269-274, 1987.

ANDRADE MGS, SÁ CN, MARCHIONNI AMT, BITTENCOURT TCBSC, SADIGURSKY M. Effects of freezing on bone histological morphology. **Cell Tissue Banking**, 9:279–287, 2008.

AQUINO RLS, GROSSI ML. **Efeito do Uso do Laser de Baixa Potência no Tratamento das Disfunções Têmporo-Mandibulares e Dor Oro-Facial: Um Ensaio Clínico Randomizado**. 151 p. Dissertação do Curso de Mestrado em Prótese da Pontifícia Universidade Católica – RS, 2005.

ARROTÉIA KF, PEREIRA LAVD. O osteoblasto. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB. **Células - Uma Abordagem Multidisciplinar**. São Paulo: Manole, 2005. p. 34-49.

ARX TV, COCHRAN DL, HERMANN JS, SCHENK RK, BUSER D. Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. A histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. **Clin Oral Impl Res**, 12:260–269, 2001.

ASLAN M, SIMSEK G, DAYI E. The Effect of Hyaluronic Acid-supplemented Bone Graft in Bone Healing: Experimental Study in Rabbits. **J Biomater Appl**, 20; 209, 2006.

ASPENBERG P. Bone replacement studies using titanium chamber models in small animals. In: Czitrom AA e Winkler H, **Orthopaedic Allograft Surgery**, New York: Springer Wien, 1996. p. 53-60.

BAPTISTA AD, SORRILHA A, TORMES TAM et al. Estudo histológico dos enxertos ósseos homólogos humanos (a histological study of human allografts). **Acta ortop Bras**, 11(4):220-224, 2003.

BAUER TW. An Overview of the Histology of Skeletal Substitute Materials. **Arch Pathol Lab Med**, 131:217–224, 2007.

BAUER TW, MUSCHLER GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. **Clin Orthop Relat Res**, 371:10-27, 2000.

BELOTI MM, MARTINS JRW, XAVIER SP, ROSA AL. In vitro osteogenesis induced by cells derived from sites submitted to sinus grafting with anorganic bovine bone. **Clin Oral Impl Res** 19: 48-54, 2008.

BETZ RR. Limitations of allograft and autograft. **Orthopedics**, 25(2): 561-570, 2002.

BOSTROM MPG, SEIGERMAN DA. The clinical use of allograft, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study. **HSSJ**, 1(1):9-18, 2005.

BRAND RA. 50 Years Ago in CORR: Physiologic Basis of Bone-Graft Surgery Marshall R. Urist. **Clin Orthop Relat Res**, 466:2015–2016, 2008.

BRUGNERA JR A. et al. **Atlas de Laserterapia aplicada à Clínica Odontológica**. São Paulo: Santos, 2003. 119 p.

BRUGNERA Jr. A. Laser Phototherapy in Dentistry. **Photomedicine and Laser Surgery**, 27(4): 533-534, 2009.

BURCHARDT H, JONES H, GLOWCZEWSKIE F, RUDNER C, ENNEKING WF. Freeze-dried allogeneic segmental cortical-bone grafts in dogs. **J Bone Joint Surg Am**, 60:1082-1090, 1978.

CAMPANHA BP, GALLINA C, GEREMIA T, LORO RCD, VALIATI R, HÜBLER R, OLIVEIRA MG. Low-Level Laser Therapy for Implants Without Initial Stability. **Photomedicine and Laser Surgery**, 28(3):365-369, June, 2010.

CAMPANHA BP, OLIVEIRA MG, GALLINA C, GEREMIA T. **Implantes Dentais sem Estabilidade Inicial sob a Irradiação Laser de Baixa Potência: Avaliação da Ancoragem Através do Torque de Remoção**. 133 p. Tese do Curso de Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Pontifícia Universidade Católica – RS, 2004.

CARVALHO DCL, ROSIM GC, GAMA LOR, et al. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. **Rev Saúde Pública**, 36(5):647-654, 2002.

CERQUEIRA A, SILVEIRA RL, OLIVEIRA MG, SANT'ANA FILHO M, HEITZ C. Bone tissue microscopic findings related to the use of diode laser (830 nm) in ovine mandible submitted to distraction osteogenesis. **Acta Cir Bras**, [serial on the Internet] 22(2): 92-97, Mar-Apr 2007.

CHIAPASCO M, ZANIBONI M, BOISCO M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. **Clin Oral Impl Res**, 17(2):136–159, 2006.

DELLOYE C, CNOCKAERT N, CORNU O. Bone Substitutes in 2003: An Overview. **Acta Orthop Belg**, 69(1):1-8, 2003.

DEPAULA CA, TRUNCALE KG, GERTZMAN AA, SUNWOO MH, DUNN MG. Effects of hydrogen peroxide cleaning procedures on bone graft osteoinductivity and mechanical properties. **Cell and Tissue Banking**, 6:287–298, 2005.

DIRESTA GR, MANOSO MW, NAQVI A, ZANZONICO P, SMITH-JONES P, TYLER W, MORRIS C, HEALEY JH. Bisphosphonate Delivery to Tubular Bone Allografts. **Clin Orthop Relat Res**, 466:1871–1879, 2008.

DÖRTBUDAK O, HAAS R, MALLATH-POKORNY G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. **Clin Oral Impl Res**, 11:540-555, 2000.

DÖRTBUDAK O, HAAS R, MALLATH-POKORNY G. Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. **Clin Oral Impl Res**, 13:288-292, 2002.

EHRHART N, KRAFT S, CONOVER D, ROSIER RN, SCHWARZ EM. Quantification of Massive Allograft Healing with Dynamic Contrast Enhanced-MRI and Cone Beam-CT. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, 466(8):1897, Aug., 2008.

FEUILLE F, KNAPP CI DDS, BRUNSVOLD MA, MELLONIG JT. Clinical and Histologic Evaluation of Bone-Replacement Grafts in the Treatment of Localized Alveolar Ridge Defects. Part 1: Mineralized Freeze-Dried Bone Allograft. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, 23(1): 28-35, 2003.

FINKEMEIER CG. Bone-Grafting and Bone-Graft Substitutes. **J Bone Joint Surg Am**, 84:454-464, 2002.

GALEA G, KEARNEY JN. Clinical effectiveness of processed and unprocessed bone. **Transf Med**, 15:165-174, 2005.

GERBI MEM, PINHEIRO ALB, MARZOLA C, et al. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone irradiated at 830 nm. **Photomed Laser Surg**, 23(4):382-388, Aug., 2005.

GOLDBERG VM, STEVENSON S. Natural history of autografts and allografts. **Clin Orthop Philadelphi**, 225(1):7-16, 1987.

GUIMARÃES KB, OLIVEIRA MG, WEBER JBB. **Fotoengenharia do processo de reparo ósseo induzido pela laserterapia de baixa potencia (GaAlAs): estudo em fêmures de ratos**. 155 p. Dissertação de Mestrado. PUC-RS. 2006.

HAAS R, HAIDVOGL D, DONATH K, WATZEK G. Freezedried homogeneous and heterogeneous bone for sinus augmentation in sheep. **Clin Oral Impl Res**, 13:396–404, 2002.

HERNÁNDEZ-GIL FT, GRACIA MAA, PINGARRÓN MDC, JEREZ LB. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, 11:E47-51, 2006.

HOEXTER, DL. Classification of Bone Regeneration and Graft Materials. **Spectrum**, 52-56, May/June, 2003.

HOFMANN A, KONRAD L, HESSMANN MH et al. The influence of bone allograft processing on osteoblast attachment and function. **J Orthop Res**, 23:846-854, 2005.

ILGENLI T, DÜNDAR N, KAL BI. Demineralized freeze-dried bone allograft and platelet-rich plasma vs platelet-rich plasma alone in infrabony defects: a clinical and radiographic evaluation. **Clin Oral Invest**, 11:51–59, 2007.

INODA H, YAMAMOTO G, HATTORI T. rh-BMP2-induced ectopic bone for grafting critical size defects: a preliminary histological evaluation in rat calvariae. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 36:39–44, 2007.

JAKSE N, PAYER M, TANGL S, BERGHOLD A, KIRMEIER R, AND LORENZONI M. Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation: an experimental study on sheep. **Clin Oral Impl Res**, 18:517-524, 2007.

JENSEN TB, RAHBEK O, OVERGAARD S, SØBALLE K. No effect of platelet-rich plasma with frozen or processed bone allograft around noncemented implants. **International Orthopaedics**, (SICOT) 29:67–72, 2005.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. **Histologia Básica**. 11^a Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 542 p.

KARU T. Photobiological Fundamentals of Low Power Laser Therapy. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, 23(10): 1703-1717, Oct. 1987.

KARU T, KOLYAKOV SF, PYATIBRAT LV, MIKHAILOV EL, KOMPANETS ON. Irradiation with a diode at 820nm induces changes in circular dichroism spectra (250-750nm) of living cells. **IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron**, 7:976, 2001.

KAHNBERG K-E. **Enxertos ósseos para implantes na maxila**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 110 p.

KATCHBURIAN E, ARANA V. **Histologia e Embriologia Oral - Texto, Atlas, Correlações Clínicas**. 2^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388 p.

KAUFMAN E, WANG PD. Localized Vertical Maxillary Ridge Augmentation Using Symphyseal Bone Cores: A Technique and Case Report. **Int J Oral maxillofac Implants**, 18:293–298, 2003.

KEITH Jr JD. Localized ridge augmentation with a block allograft followed by secondary implant placement: a case report. **Int J Periodontics Restorative Dent**, 24(1):11-17, 2004.

KEITH Jr JD, PETRUNGARO P, LEONETTI JA, et al. Clinical and histologic evaluation of a mineralized block allograft: results from the developmental period (2001-2004). **Int J Periodontics Restorative Dent**, 26(4):321-7, Aug. 2006.

KHADRA M, RONOLD HJ, LYNGSTADAAS SP, ELLINGSEN JE, AND HAANÆS HR. Low-level laser therapy stimulates bone– implant interaction: an experimental study in rabbits. **Clin Oral Impl Res**, 15:325-332, 2004.

KONDELL PA, MATTSSON T, ASTRAND P. Immunological responses to maxillary on-lay allogeneic bone grafts. **Clin Oral Implants Res**, 7(4):373-377, 1996.

LEONETTI JA, KOUP R. Localized maxillary ridge augmentation with a block allografts for dental implant placement: case reports. **Impl Dent**, 12(3):217-226, 2003.

LEVANDOWSKI Jr. N, PFEIFER AB, PAZA AO, VALIATI R, SILVA MRPB. Utilização do osso alógeno em bloco para aumento de rebordo alveolar: revisão da literatura. The use of allogeneic bone block for alveolar ridge augmentation:a literature review. **Revista Implantnews**, 5(1):51-7, 2008.

LEWANDROWSKI KU, REBMANN V, PASSLER M, et al. Immune response to perforated and partially demineralized bone allografts. **J Orthop Sci**, 6(6):545-55, 2001.

LEWANDROWSKI KU, TOMFORD WW, MICHAUD H, FLOTTE TF. Improved osteoinduction of cortical bone allografts. A study of the effects of laser perforation and partialdemineralization. **J Ortho Res**, 15:748–756, 1997.

LONG JR. WG, EINHORN TA, KOVAL K, MCKEE M, SMITH W, SANDERS R, WATSON T. Bone Grafts and Bone Graft Substitutes in Orthopaedic Trauma Surgery. A Critical Analysis. **J Bone Joint Surg Am**, 89:649-658, 2007.

LOPES LA. **Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência.** 133 p. Dissertação de mestrado [On-line]. USP. Disponível: <http://www.forp.usp.br/restauradora/laser/Luciana/fibroblasto.html>. 1999.

LYFORD RH, MILLS MP, KNAPP CI, et al. Clinical evaluation of freeze-dried block allografts for alveolar ridge augmentation: a case series. **Int J Periodontics Restorative Dent**, 23(5):417-425, 2003.

MALININ T, TEMPLE HT. Comparison of frozen and freeze-dried particulate bone allografts. **Cryobiology**, 55:167–170, 2007.

MERLI LA, SANTOS MTBR, GENOVESE WJ, FALOPPA A. Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. **Photomed Laser Surg**, 23(2):212-215, Apr. 2005.

NATHER A. Biology of healing of large deep-frozen cortical bone allograft. In Phillips GO. **Bone Biology and Healing: An Advances in Tissue Banking Specialist Publication.** Singapore: World Scientific Publishing, 2003. p. 47-67

NICOLAU RA, JORGETTI V, RIGAU J, PACHECO MTT, 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**, 18(2):89-94, 2003.

NORMAN-TAYLOR FN, VILLAR RN. Bone allograft: a cause for concern? **J Bone Joint Surg**, [Br], 79-B:178-80, 1997.

OBRADOVIĆ RR, KESIĆ LG, PEŠEVSKA S. Influence of low-level laser therapy on biomaterial osseointegration: a mini-review. **Lasers Med Sci**, 24:447–451, 2009.

PERROT DH, SMITH RA, KABAN LB. The use of fresh frozen allogeneic bone for maxillary and mandibular reconstruction. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 21(5):260-5, Oct, 1992.

PETRUNGARO PS, AMAR S. Localized ridge augmentation with allogenic block grafts prior to implant placement: case reports and histologic evaluations. **Impl Dent**, (14)2:139-148, 2005.

PINHEIRO ALB, LIMEIRA Jr FA, GERBI MEM, RAMALHO LMP, MARZOLA C, PONZI EAC. Effect of Low Level Laser Therapy on the Repair of Bone Defects Grafted with Inorganic Bovine Bone. **Braz Dent J**, 14(3):177-181, 2003.

PINHEIRO ALB, GERBI MEM. Capítulo 15: Laserterapia: uma visão atual sobre as aplicações clínicas na prática implantodôntica. In: QUERIDO, M. R. M.; FAN, Y. L. **Implantes Osseointegrados - Inovando Soluções**. São Paulo: Artes Médicas, 2004. p.285-288 e 297-298.

PINHEIRO AL, GERBI MEM. Photoengineering of bone repair processes. **Photomed. Laser Surg**, 24:169-178, 2006.

PINHEIRO ALB, GERBI MEM, LIMEIRA JR FA, et al. Bone repair following bone grafting hydroxyapatite guided bone regeneration and infra-red laser photobiomodulation: a histological study in a rodent model. **Lasers Med Sci**, 24:234–240, 2009.

PONTUAL MAB, MAGINI RS. **Plasma Rico em Plaquetas e Fatores de Crescimento**. São Paulo: Santos, 2004. 308 p.

PRIPATNANONT P, NUNTANARANONT T, VONGVATCHARANON S, LIMLERTMONGKOL S. Osteoconductive Effects of 3 Heat-Treated Hydroxyapatites in Rabbit Calvarial Defects. **J Oral Maxillofac Surg**, 65:2418-2424, 2007.

R Development Core Team (2008). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

ROCHKIND S, KOGAN G, LUGER EG, SALAME K, KARP E, GRAIF M, WEISS J. Molecular structure of the bony tissue after experimental trauma to the mandibular region followed by laser therapy. **Photomed Laser Surg**, 22(3):249-253, 2004.

SAITO S, SHIMIZU N. Stimulatory effects of low-laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in rat. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, St. Louis, 111(5):525-532, May 1997.

SÁNCHEZ AR, SHERIDAN PJ, KUPP LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, 18:93–103, 2003.

SILVA Jr. AN, PINHEIRO ALB, OLIVEIRA MG, WEISMANN R, RAMALHO LMP, NICOLAU RA. Computerized morphometric assessment of effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, 20(2):83-87, Apr. 2002.

STEIN A, BENAYAHU D, MALTZ L, ORON U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Photomed Laser Surg**, 23(2):161-166, 2005.

TOMFORD WW. Bone allografts: past, present and future. **Cell Tissue Bank**, 1(2):105-109, 2000.

TORRES CS, SANTOS JN, MONTEIRO JSC, AMORIM PGM, PINHEIRO ALB. Does the Use of Laser Photobiomodulation, Bone Morphogenetic Proteins, and Guided Bone Regeneration

Improve the Outcome of Autologous Bone Grafts? An in Vivo Study in a Rodent Model. **Photomedicine and Laser Surgery**, 26(4):371-377, August 2008.

TRUMEEES E, HERCOWITZ HN. Alternatives to autologous bone harvest in spine surgery. **University of pennsylvania orthop j**, 12:77-88, 1999.

VACCARO AR. The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. **Orthopedics**, 25(5):571-578, 2002.

WALLACE S, GELLIN R. Clinical Evaluation of Freeze-Dried Cancellous Block Allografts for RidgeAugmentation and Implant Placement in the Maxilla. **Implant Dent**, 19:272–279, 2010.

WEBER JB, PINHEIRO AL, DE OLIVEIRA MG, OLIVEIRA FA, RAMALHO LM. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. Photomed. **Laser Surg**, 24:38-44, 2006.

WILLIAMSON RA. Rehabilitation of the resorbed maxilla and mandible using autogenous bone grafts and osseointegrated implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, 11(4):476-88, Jul-Aug, 1996.

ZADEH HH. Implant Site Development: Clinical Realities of Today and the Prospects of Tissue Engineering. **CDA Journal**, 32(12): 1011-1020, December, 2004.

ZIPFEL GJ, GUIOT BH, FESSLER RG. Bone Grafting. **Neurosug Focus**, 14(2):1-8, 2003.



Apêndices

APÊNDICE A

Artigo científico relacionado ao tema da Tese publicado como autor em 2008

LEVANDOWSKI Jr. N, PFEIFER AB, PAZA AO, VALIATI R, SILVA MRPB. Utilização do osso alógeno em bloco para aumento de rebordo alveolar: revisão da literatura. The use of allogeneic bone block for alveolar ridge augmentation: a literature review. **Revista Implantnews**, 5(1):51-7, 2008.

Revisão da Literatura

Utilização do osso alógeno em bloco para aumento de rebordo alveolar: revisão da literatura

The use of allogeneic bone block for alveolar ridge augmentation: a literature review

Nelson Leonardo de Jesus Jr*
 Ariar Braga Pfeifer**
 Aleysson Olímpio Riza***
 Renato Viñali****
 Marcos R. Pupo Baptista Sílva**

RESUMO

Apesar da segurança proporcionada pelo osso autógeno para a correção de defeitos alveolares é constante a busca de alternativas que eliminem ou diminuam a morbidade de uma segunda região operada. Com o advento das técnicas de regeneração óssea guiada é também crescente o interesse pelo uso do osso alógeno. Esse trabalho tem por objetivo fazer uma revisão da literatura sobre o uso do osso alógeno em bloco para a reconstrução de rebordos alveolares deficientes, associado ao tratamento com implantes dentários.

Unitermos - Enxerto ósseo; Aloenxerto; Aumento do rebordo alveolar; Implantes dentários; Osseointegração.

ABSTRACT

Despite the safety using the autograft on alveolar ridge defects reconstruction, the search for alternatives that permit minimize the donor site morbidity is ceaseless. The interest for allografts increased with the approach of guided bone regeneration. The aim of this paper is to review the literature about the use of allogeneic bone block for alveolar ridge augmentation, associated with dental implants.

Key Words - Bone grafting; Allograft; Alveolar ridge augmentation; Dental implants; Osseointegration.

CADERNO CIENTÍFICO

Recebido em: jan/2007
 Aprovado em: set/2007

* Especialista em Implantodontia pela ACPG-Oral Jorville/SC.

** Mestre e especialista em Implantodontia pela Unisa/SP.

*** Doutor e mestre em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela Unicamp/SP.

**** Doutorando em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela PUCRS; Mestre em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela UFFRS.

Introdução

O tratamento com implantes osseointegrados é reconhecidamente um método seguro e previsível para reabilitar pacientes edêntulos¹. Entretanto, algumas vezes o rebordo alveolar se encontra tão reabsorvido que impossibilita a colocação de implantes. Para compensar a perda óssea, várias técnicas para aumento de rebordo alveolar foram propostas, geralmente com enxertos autógenos provenientes da crista ilíaca ou da sínfise mandibular. Bretna, Brånemark² foram um dos primeiros a descobrir a técnica para aumento ósseo de rebordo alveolar a fim de possibilitar a colocação de implantes osseointegrados.

O osso autógeno é a primeira opção (*gold standard*) quando há necessidade de reconstruir um defeito ósseo alveolar severo, por oferecer maior previsibilidade de resultado, não transmitir doenças e oferecer completa histocompatibilidade^{3,4}. Porém, em vista da necessidade de uma segunda área cirúrgica para a remoção deste osso, é crescente o interesse por alternativas.

O osso alógeno, obtido de um doador, surge como uma boa opção. Após o advento dos bancos de tecidos e a ampliação e melhoria das técnicas de preservação, é maior a disponibilidade dos aloenxertos⁵, o que vem ao encontro das necessidades da Implantodontia (Tabela 1).

TABELA 1 - TIPOS DE ENXERTOS ÓSSEOS ALÓGENOS

Tipo	Processamento e armazenagem	Esterilização
Congelado (otopreservado)	Congelado e estocado a -80°C Apropriado para grandes aloenxertos Tempo de armazenagem de pelo menos dois anos	Aquisição asséptica Irradiação Gama
Destritado ou liofilizado (FDGA)	Geralmente congelado a -30°C Exposto a baixa pressão atmosférica Apropriado para pequenas quantidades de material Tempo de armazenagem indeterminado	Irradiação Gama Óxido de Etileno
Desmineralizado (DFDGA ou DGM)	Exposto a ácidos fortes Apropriado para partículas ou pequenas quantidades	Irradiação Gama Óxido de Etileno
Fresco	Refrigerado, não congelado	Aquisição asséptica

Adaptado de Tranees, Herkowitz⁶ (1999).

Dentre as vantagens em se utilizar osso alógeno, inclui-se a maior disponibilidade óssea e a eliminação de uma segunda região cirúrgica para remoção de osso autógeno, com conseqüente prevenção da morbidade na região doadora e menor custo total do tratamento⁶.

As desvantagens dos aloenxertos envolvem o risco da transmissão de doenças e o potencial de antigenicidade, complicações estas que podem ser controladas por meio dos

métodos de processamento. O risco infeccioso também pode ser diminuído por meio de testes sorológicos dos doadores, descarte de material que produza cultura bacteriológica positiva, manipulação do enxerto sob condições assépticas e esterilização⁶.

Este trabalho tem por objetivo fazer uma revisão de literatura sobre o uso do osso alógeno em bloco para reconstrução de rebordos alveolares deficientes, associado ao tratamento com implantes dentários.

O processo de incorporação dos enxertos ósseos

O conhecimento das fases de consolidação de uma fratura é bem sedimentado. Aparentemente, a incorporação de um enxerto ósseo apresenta uma cascata similar de eventos⁷.

Um enxerto ósseo de qualquer natureza, até a sua incorporação final, passa por diferentes fases que são didaticamente divididas em inflamação, revascularização, osseificação, osseococondição e remodelação⁸.

Logo após a instalação do enxerto, ocorre um processo inflamatório inicial e um aumento da atividade vascular na região receptora^{9,10}, mediados por fatores de crescimento e indutores, principalmente o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento de transformação β (TCF- β)¹¹. O papel das plaquetas como a maior fonte de PDGF ressalta a importância do coágulo sanguíneo na reparação óssea¹².

A incorporação depende de íntimo contato do enxerto com o tecido vascularizado do hospedeiro¹³. A existência de espaço entre os fragmentos inibe a passagem dos sinais moleculares e a criação de uma estrutura osteocondutiva⁷. Ainda, a estabilidade do enxerto é essencial, pois a revascularização não ocorrerá em uma superfície instável. A revascularização parece ser um fator chave na incorporação óssea, pois os osteoblastos são ativos apenas quando adjacentes a vasos sanguíneos¹⁴.

No interior do enxerto autógeno, as células que não foram mantidas pela difusão de nutrientes, através de adequada revascularização, apresentam necrose¹⁵. A necrose também ocorre em conseqüência de trauma cirúrgico e procedimentos como desgastes (descorticalização) da área receptora. Com a morte celular, há liberação dos produtos intracelulares. Esses produtos, aliados a uma baixa tensão do oxigênio e da redução do pH, servem como quimiotáticos para células osteoprogenitoras indiferenciadas da área receptora^{16,17}. Por volta do quinto dia ocorre atração dos macrófagos para a área enxertada e os processos reparativos passam a ser estimulados pelos fatores de crescimento derivados dos macrófagos (MDCF)¹⁸.

As células mortas são removidas pelos macrófagos, criando espaços e canais para a invasão dos vasos sanguíneos

do tecido circundante. São estes vasos que darão suporte aos elementos celulares adicionais (osteoblastos e osteoclastos)²⁶.

A velocidade com que o enxerto será revascularizado dependerá do fato de ser cortical ou medular. A arquitetura porosa do osso medular permite revascularização mais rápida e completa do tecido em relação ao que normalmente é visto no osso cortical, levando aproximadamente duas semanas⁹. A reparação óssea nesse caso é iniciada logo após a instalação do enxerto, pois a ação dos osteoblastos não necessita da fase prévia de reabsorção pelos osteoclastos²⁷.

O interior do osso cortical não é penetrado por vasos sanguíneos antes de uma semana. Neste caso o reparo é iniciado por osteoclastos⁹. Por volta da quarta semana, após a revascularização do enxerto e reparo quase completo da área, os macrófagos deixam a área²⁸ e dão lugar aos osteoblastos, numa cascata mediada por outros fatores químicos²⁷. Ocorre a liberação das proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), que agem nas células adjacentes do canal medular e nos pré-osteoblastos, e induzem a proliferação e diferenciação destas células em osteoblastos funcionais, que irão secretar a matriz óssea²⁷.

Existirá, então, uma mistura de osso viável e osso sem vitalidade, que será gradualmente substituído por novo osso a partir da segunda semana até os seis meses seguintes. Áreas de novo osso e osso não vital podem coexistir durante anos após a enxertia. Uma formação óssea significativa normalmente ocorre após 12 semanas, e coincide com a fase de consolidação da união enxerto-hospedeiro^{27,28}.

TABELA 2 – TERMINOLOGIA PARA O ESTUDO DOS ENXERTOS ÓSSEOS

Enxerto Autólogo	Tecido removido de uma área do esqueleto e transferido para outra área no mesmo indivíduo. Autólogo é o adjetivo substituído do termo autólogo.
Enxerto Alógeno	É o tecido transplantado entre indivíduos não idênticos da mesma espécie. Alógeno é o adjetivo substituído ao termo homogêneo.
Enxerto Xenógeno	É o tecido transplantado entre indivíduos de espécies diferentes. Xenógeno é o adjetivo que substitui heterogêneo.
“Crawling Substituição”	Vem de uma frase Germânica - “ersatz schleichende”. Refere-se à invação de novo osso através dos canais abertos pelos vasos sanguíneos ou através dos canais de Havers ou de Volkmann pré-existent no osso transplantado.
Incorporação	Processo de união do material enxertado (independente da origem) com o tecido receptor.
Osteocondição	É um fenômeno de superfície, e está relacionado com a habilidade do enxerto de suportar a ligação e a migração das células osteogênicas.
Osteoindução	Diz respeito à propriedade do enxerto de induzir células-tronco indiferenciadas (células osteoprogenitoras) a se diferenciarem em osteoblastos.
Osteogênese	É a formação de novo osso a partir de células remanescentes no enxerto ósseo.

A partir deste momento o enxerto progride para um osso maduro e funcional, através de um ciclo normal de reabsorção e aposição óssea (creeping substitution)^{29,30}, Tabela 2.

Acredita-se que estes mesmos processos ocorram com o osso alógeno, porém mais lentamente, devido à maior reação inflamatória inicial e menor revascularização²⁹.

Estudos em maxilas edêntulas de macacos³¹ demonstraram que, assim como o osso autólogo, os enxertos alógenos corticais liofilizados tendem a ser totalmente reabsorvidos e substituídos por novo tecido ósseo. Porém, a remodelação do aloenxerto ocorre aproximadamente três meses mais tarde em relação ao autoenxerto.

Utilização do osso alógeno em bloco para aumento de rebordo alveolar

A reconstrução de defeitos alveolares com blocos ósseos é comum e fundamental para a colocação de implantes em uma posição ideal, com consequente restauração protética adequada.

Embora exista um grande número de artigos relacionados ao osso alógeno em bloco nas áreas da Ortopedia e Traumatologia médica, poucos casos foram relatados em reconstruções de rebordos alveolares na Odontologia. O maior número de artigos acerca do uso do osso alógeno na Odontologia está relacionado ao osso liofilizado particulado.

O osso alógeno para enxertos em bloco é utilizado pelo menos desde os anos 60 para correção de deformidades maxilofaciais^{32,33}, com resultados bastante semelhantes à enxertia autóloga, entretanto com reabsorção e incorporação mais lentas.

A partir da década de 90, os implantes de titânio e próteses sobreimplantes começaram a ser relacionados com os enxertos alógenos em bloco^{34,35} (Tabela 3). Os primeiros casos relatados³⁶ mostraram que os enxertos ósseos apresentavam consistência firme, bem incorporados e bem vascularizados no momento da colocação dos implantes, o que permitiu a reabilitação protética sobre os implantes em todos os pacientes tratados.

A questão inicial recaía sobre eventuais reações imunológicas indesejáveis frente ao enxerto alógeno. Com tal preocupação, monitorou-se os anticorpos no sangue periférico e realizou-se biópsias nos tecidos moles e duros no momento da colocação dos implantes na região enxertada e também no momento da reabertura dos implantes³⁷. Não houve sinais de reação aguda de rejeição. As biópsias realizadas na colocação dos implantes mostraram tecido ósseo vital bem vascularizado intercalado com tecido fibroso. O exame das biópsias realizadas no momento da reabertura (12 meses em média) mostrou osso bem mineralizado.

Na literatura pesquisada, encontrou-se dois estudos multicentro com volume satisfatório de informações. O primeiro, um estudo retrospectivo³⁸, avaliou pacientes

TABELA 3 - REVISÃO NA LITERATURA DO EMPREGO DO OSSO ALÓGENO EM BLOCO PARA RECONSTRUÇÃO DE REBORDOS ALVEOLARES

Autor	Ano	Material utilizado	Ossos	Espera *	Implantes	Carga*	Falhas	Biópsia†
Perrot ²²	1992	Oso ortopreservado	10	8,3	29	26,3	1	-
Kandel ²³	1996	Oso ortopreservado	4	8	23	18,5	1	+
Racci et al ²⁴	2000	Blocos FDGA	2	5	5	12	0	-
Navarro Jr ²⁵	2002	Oso ortopreservado	35	6,1	114	10,3	3	-
Lesnetti e Kouy ²⁶	2003	Blocos FDGA	4	8	5	-	0	+
Lyford et al ²⁷	2003	Blocos FDGA	3	8	4	-	0	-
Keith Jr ²	2004	Blocos FDGA	1	4	1	8	0	-
Petrongaro e Amar ²⁸	2005	Blocos FDGA	3	4	8	14 a 26	0	+
Keith Jr et al ²⁹	2006	Blocos FDGA	73	4 a 6	97	25 a 36	1	+
TOTAL			135		286		6	

* referente aos meses entre o aumento ósseo e a colocação dos implantes.

* período (meses) de acompanhamento após a colocação de carga.

† todos os casos em que a biópsia foi realizada apresentaram vitalidade celular (+), (-) biópsia não realizada.

de seis centros de pós-graduação na cidade de Curitiba, Paraná. Dos 35 pacientes submetidos a procedimentos de enxertos aposicionais, 18 receberam implantes e próteses sobreimplantes e foram acompanhados por um período de até 24 meses. O índice de sucesso dos enxertos foi de 88,5% (quatro falhas totais) e dos 114 implantes colocados apenas três falharam, com índice de sucesso de 96,5%. O autor citou como complicações pós-operatórias: reação inflamatória (um caso), exposição óssea (três casos), necrose óssea (um caso) e reabsorção óssea exagerada (quatro casos). Relatou também que os casos onde o tempo de espera de consolidação óssea foi menor que seis meses, houve maior índice de falhas tanto nos enxertos quanto nos implantes. O índice de sucesso foi maior quando o tempo de reparo era acima de nove meses e sugeriu o tempo ideal de 12 meses para a incorporação e remodelação de blocos corticais.

O outro estudo multicentro prospectivo encontrado na literatura²⁹ envolveu 73 pacientes e 82 reconstruções alveolares. Constatou o sucesso de 93% dos blocos em 12 meses, e 99% dos implantes, em um período de 25 a 36 meses após a colocação de carga. Dos 97 implantes colocados em 52 áreas enxertadas, houve apenas uma perda, sem comprometer o enxerto, o que possibilitou a colocação de outro implante e posterior restauração protética. Dos sete blocos que apresentaram falhas (8,5% do total), cinco localizavam-se na região posterior de mandíbula. Outros sete casos apresentaram descência dos tecidos moles ou infecção, sem comprometimento do enxerto

ou dos implantes. Os autores afirmam que os casos de falhas dos enxertos estavam ligados a contorno inadequado do bloco, colocação incorreta dos parafusos de fixação, intrusão e pressão da prótese provisória e/ou infecção secundária resultante da inflamação dos tecidos moles e excesso de placa.

Apesar do maior potencial imunogênico do osso alógeno, todos os autores pesquisados relataram que o pós-operatório dos pacientes tratados com este material foi menos traumático em relação à enxertia autóloga. Os casos que apresentaram falhas pareciam estar relacionados com causas não imunológicas, como erro de técnica ou infecção bacteriana^{4,19,20}.

O acompanhamento radiográfico da evolução da incorporação de enxertos alógenos aposicionais em maxila e mandíbula mostra que a borda que separa o enxerto do tecido ósseo receptor se torna menos nítida a partir de seis a oito semanas. Entre seis a 12 meses os enxertos geralmente não podem mais ser identificados como entidades separadas, sugerindo a simultânea reabsorção do enxerto e uma gradual substituição por novo osso^{21,22,23}.

As biópsias realizadas no momento da colocação dos implantes evidenciaram a deposição de novo osso e até mesmo ausência de resíduos do material enxertado^{19,20,21}. Não houve relatos de reação imunológica indesejável em nenhum caso. Os anticorpos pesquisados não foram detectados no sangue periférico, o que pareceu demonstrar que o osso alógeno e implantes de titânio podiam ser usados na reconstrução de maxilas extremamente reabsorvidas²⁰.

Discussão

Como a maioria dos trabalhos sobre a incorporação óssea vem da área da Ortopedia, as amostras analisadas possuem tamanho e volume muito maiores dos utilizados na implantodontia, comumente alcançando vários centímetros¹⁴. No rebordo alveolar, o aumento médio esperado é de 4 mm a 5 mm em espessura e 1 mm a 2 mm em altura (Figura 1).

Pequenas quantidades de osso alógeno tendem a ser completamente remodeladas em humanos. Grandes aloexertos têm remodelação limitada à camada superficial, permanecendo o seu núcleo desvitalizado¹⁴.

Conforme a literatura avaliada, percebe-se que os aloexertos sofrem alterações biológicas que são qualitativamente similares aos autoexertos, porém ocorrem mais lentamente, devido à maior reação inflamatória inicial possuir reabsorção e revascularização mais lentas e não fornecer um conteúdo celular que, teoricamente, poderia funcionar como um "gatilho" para neoformação óssea^{14,20}. Este atraso de cerca de três meses no período de incorporação deve ser levado em conta no momento da colocação de implantes osseointegrados.

Para alguns autores²⁴, o exerto cortical autólogo não permite difusão suficiente para sustentar a sobrevivência de nenhuma fração de osteócitos viáveis após o procedimento. Portanto, estes segmentos não são realmente osteogênicos, mas fornecem um substrato osteocondutivo para a formação de osso pelo hospedeiro. O uso do osso autólogo cortical (intra-bucal) também elimina o risco de reações imunológicas, mas de uma maneira geral, em pequenas reconstruções, oferece pouca vantagem em relação ao osso cortical alógeno, particularmente quando a morbidade é considerada¹⁴.

Apesar de ser utilizado principalmente por suas propriedades osteocondutoras, o osso alógeno parece não ser apenas uma estrutura inerte. Foi demonstrado recentemente²⁶ que as proteínas ósseas do enxerto alógeno hiofilizado permanecem ativas e estimulam as células tronco mesenquimais (provenientes de aspirado modular autólogo) a se diferenciar em osteoblastos funcionais. A associação de aspirado modular e osso alógeno já foi utilizada com sucesso para aumento de rebordo alveolar e reabilitação com implantes osseointegrados²⁷.

Ainda assim, a carência de função osteogênica acaba sendo a grande desvantagem do osso alógeno (Tabela 4). Esta propriedade parece não estar relacionada diretamente com a multiplicação das células viáveis do enxerto, mas sim com fatores quimiotáticos liberados após a morte celular^{14,28}. A série de trabalhos de um autor²⁹, na década de 60, demonstrou que a adição de osso autólogo modular ou de aspirado de modula óssea melhorava as propriedades biológicas dos aloexertos, com capacidade de induzir e promover a osteogênese a partir da estimulação de células primordiais dos tecidos adjacentes.

Entretanto, a literatura disponível sobre enxertos ósseos

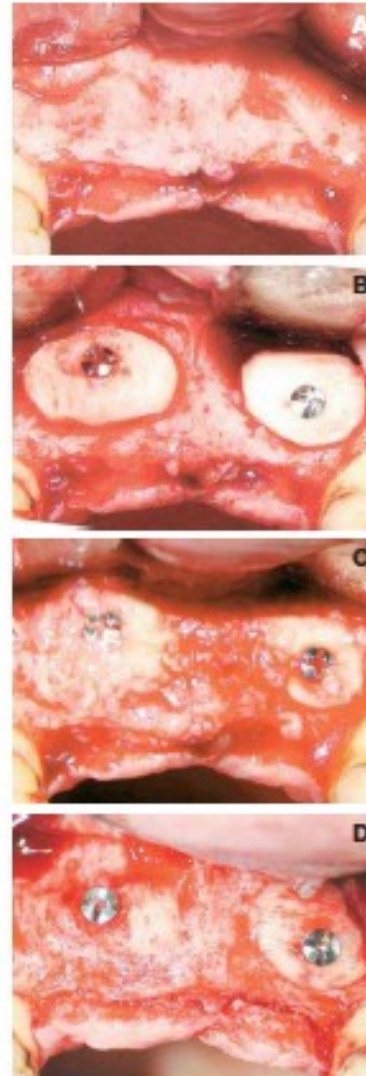


Figura 1
Aspecto clínico da consolidação e remodelação do osso alógeno criopreservado.
A. Inicial.
B. Instalação dos blocos.
C. Preenchimento dos espaços com osso particulado.
D. Preparação para colocação de implantes seis meses.

alógenos em rebordos alveolares é limitada e deficiente. Se forem adotados os critérios da Academia Americana de Osseointegração (American Academy of Osseointegration - AAO)³⁰, em toda a literatura pesquisada apenas quatro trabalhos relatam um mínimo de dez implantes colocados, acompanhamento longitudinal em função e descrevem os índices de sucesso^{24, 26, 27, 29}.

Os quatro trabalhos em questão relataram um total de 122 casos com 263 implantes colocados e seis perdas (2,3%) em um período de acompanhamento que variou de dez a 36 meses. Os casos que apresentaram falhas pareciam estar

relacionados com causas não imunológicas, como deficiência técnica (contorno inadequado do bloco ou impossibilidade de recobrimento por tecido mole) ou infecção bacteriana.

Para efeito de comparação, o relatório da AAO²⁸ realizado através de revisão da literatura entre 1980 e 2005, relatou apenas 753 implantes colocados em regiões enxertadas com osso autógeno proveniente de crista filarica, com índice de sobrevivência de 88%. Em regiões que receberam osso autógeno intrabucal, 58 implantes foram colocados com índice de 100% de sucesso (Tabela 5). Segundo este relatório não existe literatura suficiente para estabelecer um consenso nem mesmo quanto à utilização de enxertos autógenos. Com exceção à regeneração óssea guiada, as técnicas de aumento de rebordo alveolar não possuem documentação detalhada, nem acompanhamento longitudinal suficiente, embora os resultados clínicos demonstrem a viabilidade da técnica.

O consenso da Associação Europeia para Osso-integração (European Association for Osseointegration - EAO)²⁹ afirmou que as técnicas de aumento de rebordo com osso autógeno eram bastante documentadas, porém a qualidade metodológica da maioria dos artigos publicados era muito pobre e se fazia necessário um maior número de ensaios clínicos bem delineados com acompanhamento em longo prazo.

Com base na literatura pesquisada percebe-se que apesar de resultados clínicos satisfatórios até o momento, há um limitado número de trabalhos sobre reconstrução de rebordo alveolar com osso alógeno e a literatura disponível não apresenta uma qualidade metodológica que justifique o uso do osso alógeno quando o osso autógeno estiver disponível. Existe, ainda, a necessidade de mais estudos que demonstrem a viabilidade óssea e a osso-integração dos implantes colocados em osso alógeno e também maior número de estudos longitudinais prospectivos para que se possa desenvolver uma metodologia que ofereça segurança para o paciente e para o profissional.

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DOS ÍNDICES DE SUCESSO DE IMPLANTES COLOCADOS EM OSSO AUTÓGENO E ALÓGENO

Fonte		Casos		Implantes	Successos
EAO ²⁸	Osso autógeno	875	700	4445	82,5%
	Intra-oral autógeno		147		97,1%
AAO ²⁸	Osso autógeno	9 artigos		753	88%
	Intra-oral autógeno	2 artigos		58	100%
Osso alógeno ^{30,31,32}		122 (4 artigos)		263	97,7%

TABELA 4 - PROPRIEDADES DOS MATERIAIS UTILIZADOS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Material	Osteocondução	Osteoindução	Células Osteogênicas	Imunogenicidade	Morbidade da região doadora	Resistência Mecânica Inicial
Auto-exerto modular	++++	++	+++	-	+	-
Auto-exerto cortical vascularizado	+	+/-	+	-	++	++
Auto-exerto cortical	+	+/-	-	-	+	++
Alloexerto fresco	+	+/-	-	++	-	++
Alloexerto congelado	+	+/-	-	+	-	++
Alloexerto congelado e desidratado (FDGA)	+	+/-	-	-	-	+/-
DBM (DFDBA)	+	++	-	-	-	-
BMPs	-	++++	-	-	-	-
Medula óssea	-	+/-	++	-	-	-
Cerâmicas	++	-	-	-	-	-
Cerâmicas com medula óssea	++	+/-	++	-	-	-
Xenoexerto	++	-	-	+++	-	+/-

+ = fraco desempenho positivo; ++ = desempenho positivo; +++ = forte desempenho positivo; ++++ = o mais forte desempenho positivo; - = sem desempenho; +/- = pode ter algum desempenho. Adaptado de Ziffl et al¹.

Conclusão

Com base na literatura pesquisada é possível concluir que:

- Os enxertos ósseos alógenos sofrem alterações biológicas que são qualitativamente similares aos enxertos autógenos, porém ocorrem mais lentamente.
- O atraso no processo de incorporação e remodelação do osso alógeno pode ser de 40 a 90 dias para pequenos enxertos e indeterminado para enxertos extensos.
- Há um limitado número de trabalhos sobre reconstrução de rebordo alveolar com osso alógeno.

- Apesar de resultados clínicos satisfatórios, a literatura não apresenta qualidade metodológica que justifique o uso do osso alógeno quando o osso autógeno estiver disponível.
- Há necessidade de maior número de estudos longitudinais para que se possa almejar uma alternativa ao consagrado uso do osso autógeno.

Endereço para correspondência

Nelson Levandowski Junior
Rua Abdou Baitoa, 47 - Sala 402 - Centro
89201-010 - Joinville - SC
levandowski.jr@gmail.com

Referências

1. Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Helmermark PI, Jemt T. A long term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of the totally edentulous jaw. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1990; 5: 347-359.
2. Betre U, Helmermark PI. Reconstruction of alveolar jaw bone. An experimental and clinical study of immediate and performed autologous bone grafts in combination with osseointegrated implants. *Scand J Plast Reconstr Surg*, 1980; 14: 23-48.
3. Troncos E, Hericowitz HN. Alternatives to autologous bone harvest in spine surgery. *University of Pennsylvania Orthop J* 1999; 12:77-88.
4. Vaccaro AR. The role of the osseoconductive scaffold in synthetic bone graft. *Orthopedics* 2002 May;25(5 Suppl):S671-8.
5. Baptista AD, Sorilha A, Troncos TAM et al. Estudo histológico dos enxertos ósseos homólogos humanos (a histological study of human allografts). *Acta Orthop Bras* 2003;11(4):220-4.
6. Keith Jr JD. Localized ridge augmentation with a block allograft followed by secondary implant placement: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2004;24(1):11-7.
7. Zipfel GJ, Gaites BH, Fessler RG. Bone Grafting. *Neurosurg Focus* 2003;14(2):1-8.
8. Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop*. Philadelphia 1987;(225):7-16.
9. Burdardt H. Current concepts in bone grafting in Götman AA e Winkler H, *Orthopaedic Allograft Surgery*. New York: Springer-Verlag, 1996. p.3-10.
10. Galca G, Kearney JN. Clinical effectiveness of processed and unprocessed bone. *Transf Med* 2005;15:165-74.
11. Kahrberg K-E. Enxertos ósseos para implantes na maxila. Porto Alegre: Artmed; 2006.
12. Ferraz MAR, Magri RS. Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de Crescimento – das pesquisas científicas à clínica odontológica. São Paulo: Editora Sarvier, 2004. 308p.
13. Amoretta KE, Pereira LAVD. O osteoblasto. In: Carvalho HF, Collares-Brazo CB Cédulas - Uma Abordagem Multidisciplinar. São Paulo: Manole, 2005. p.34-49.
14. Bauer TW, Maschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 2000;(371):10-22.
15. Malota JA, Gasser JA, Fonseca RJ, et al. Comparison of the healing and revascularization of overlaid autologous and lyophilized allogeneic rib grafts to the edentulous maxilla. *J Oral Maxillofac Surg* 1983 Aug;41(8):487-99.
16. Boyne PJ, Coxlsey DE. Use of cartilage and bone implants in restoration of edentulous ridges. *J Am Dent Assoc*. 1965 Dec;71(6):1426-35.
17. Allard RH, Lekkas C, Swain JC. Autologous versus homologous bone grafting in osteotomies, secondary defect repairs and ridge augmentations: a clinical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987;64(3):269-74.
18. Keith Jr JD, Ferraguto F, Leonetti JA et al. Clinical and histologic evaluation of a mineralized block allograft: results from the developmental period (2001-2004). *Int J Periodontics Restorative Dent* 2006 Aug;26(4):321-7.
19. Kendall PA, Mattson T, Astrand P. Intraosseous responses to maxillary on-lay allogeneic bone grafts. *Clin Oral Implants Res* 1996;7(4):373-7.
20. Leonetti JA, Koop R. Localized maxillary ridge augmentation with a block allograft for dental implant placement: case reports. *Impl Dent* 2003;12(3):217-26.
21. Lyford RH, Mills MP, Knapp CL, et al. Clinical evaluation of freeze-dried block allografts for alveolar ridge augmentation: a case series. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003;23(5):417-25.
22. Navarro Jr W. Estudo retrospectivo multicêntrico com enxerto ósseo alógeno fresco congelado na reconstrução das maxilares com a finalidade de implantes dentais (Dissertação de Mestrado). Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.
23. Peres DH, Smith RA, Kaban LB. The use of fresh frozen allogeneic bone for maxillary and mandibular reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1992 Oct;21(5):260-5.
24. Ferraguto PS, Azeite S. Localized ridge augmentation with allogeneic block grafts prior to implant placement: case reports and histologic evaluations. *Impl Dent* 2002;1(4):139-48.
25. Ricci A, Martignoni M, Carrarazza A. Reconstrução óssea pré-implantar. *Il Dentista Moderno* 2000 Dez;26:42.
26. Razi PA, Kato F, Briggs TW, Carrion SR, Blum GW. Will Mesenchymal Stem Cells Differentiate from Osteoblasts on Allograft? *Clin Orthop Relat Res* 2007; 457: 220-226.
27. Carron SR, Kerkis I, Kerkis A, et al. Allogeneous Bone Grafts Improved by Bone Marrow Stem Cells and Platelet Growth Factors: Clinical Case Reports. *Artificial Organs*, 2007; 31(4):268-273.
28. Burwell RC. Studies in the transplantation of bone. VIII. Treated Composite Homografts-autografts of Cancellous Bone: an Analysis of Inductive Mechanisms in Bone Transplantation. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 1966; 48B(5): 532-566.
29. Aghaloo TL, Moy PK. Which Hard Tissue Augmentation Techniques are the Most Successful in Furnishing Bony Support for Implant Placement? *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2007; 22S: 49-73.
30. Chiappasco M, Zariboni M, Botco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res*. 17 (Suppl 2), 2006; 136-159.

APÊNDICE B

Artigo científico relacionado ao tema da Tese publicado como autor em 2010

CAMPANHA BP, GALLINA C, GEREMIA T, LORO RCD, VALIATI R, HÜBLER R, OLIVEIRA MG. Low-Level Laser Therapy for Implants Without Initial Stability. **Photomedicine and Laser Surgery**, 28(3): 365-369, June 2010.

Low-Level Laser Therapy for Implants Without Initial Stability

Bruno Pereira Campanha, Ph.D.,¹ Clóvis Gallina, M.Sc.,² Tomás Geremia, M.Sc.,²
 Raphael Carlos Drumond Loro, Ph.D.,² Renato Valiati, M.Sc.,²
 Roberto Hübler, Ph.D.,³ and Marlia Gerhardt de Oliveira, Ph.D.²

Abstract

Objective: This study evaluated the effect of low-level infrared laser on removal torque values of implants with poor initial stability inserted in rabbit tibias. **Background Data:** It is important to analyze the effects of laser radiation on bone repair when low-quality bone and implants with poor initial stability are used. **Materials and Methods:** Thirty male white New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) about 2 mo old and weighing 1.5–2.0 kg were used. Machined implants with poor initial stability were inserted in the tibia of each animal. Animals were randomly divided into two groups: laser irradiated and laser nonirradiated. Each group was further divided into three subgroups, according to the day the animals were killed: 15, 30, or 45 d. Torque values were measured with an axial digital torque meter that applied counter-torque. The Student's *t*-test was used to calculate means and standard deviations for the comparisons between laser and control groups. **Results:** A significant increase ($p=0.050$) in removal torque values was found in the group of laser-irradiated implants at 15 and 30 d when compared with the control groups. At 45 d, no significant differences were found. **Conclusion:** In this study, low-level laser therapy promoted the osseointegration of implants with poor initial stability, particularly in the initial stages of bone healing.

Introduction

MANY DENTAL IMPLANT studies have focused on implant surfaces and their ability to affect osseointegration characteristics favorably. Changes in the quality of bone used as implantation beds have been investigated, and successful osseointegration has also been achieved in low-quality bone and implants with little initial stability. It is within this setting that the use of low-level laser therapy (LLLT) in bone repair has been increasingly investigated. Although the action of laser radiation on bone formation has yet to be fully explained, it has thus been suggested that bone regeneration may be dependent not only on the total dose of laser radiation but also on the duration and form of irradiation.¹

Adell et al.² observed that, since the placement of osseointegrated implants has become a widely accepted procedure, studies have focused on a shorter healing time to optimize bone healing before functional loads were applied. However, success rates are limited by factors such as incorrect selection of patients, poor oral hygiene, traumatic occlusion, and lack of irrigation during surgery. Moreover, low

bone quality (low bone density) is still a major cause of implant failure.

Safe osseointegration depends on seven factors: biocompatibility of implant materials, implant design, implant surface, surgical access, patient conditions, biomechanical status, and time. Additionally, the failure of dental implants to achieve osseointegration may also be attributed to the lack of primary stability and micromovements during healing.³

Several studies have evaluated the effects of LLLT on bone repair in surgical defects created on rat femurs.^{4–6} Results showed greater and faster bone formation in the irradiated defects, and the authors concluded that gallium-aluminum-arsenide (GaAlAs) LLLT promoted effective bone repair biomodulation of surgical wounds when compared with control groups.

Laser therapy with infrared wavelengths has been shown to stimulate osteoblastic proliferation, collagen deposition, and bone formation if applied in the initial stages of bone repair, when cell proliferation is predominant. Vascular responses to laser therapy are considered as one of the possible explanations for positive clinical results, since the

¹School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

²School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

³School of Physics, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

mechanisms of bone stimulation are still unclear and may be attributed to systemic effects or the isolated stimulation of osteoblasts.¹

Dörbudač et al,⁹ in a study in baboons, showed that osteocyte viability was significantly higher in the samples subjected to laser irradiation immediately after implant site drilling and implant insertion than in the control sites, a result that may have a positive effect on implant integration. Bone resorption rate, in contrast, was not affected by laser irradiation.

Our hypothesis, in the present study, is that the removal torque value of titanium implants inserted with rotational freedom (no initial stability) in rabbit tibias will increase when implants are submitted to LLLT, according to the laser therapy protocol proposed in this study, with 15-, 30-, and 45-d follow-up assessment.

Materials and Methods

This study was evaluated and approved by the Research Ethics Committee of the School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, under approval number 0030/03.

Thirty white male New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) about 2 mo old and weighing 1.5–2.0 kg were randomly divided into two treatment groups: a laser-irradiated group (L), and a nonirradiated group (C). These groups were further subdivided into three groups, according to the day the animals were killed: 15 (L1 and C1), 30 (L2 and C2), and 45 (L3 and C3) d after initial laser therapy.

Surgical procedures, maintenance, and animal killing were conducted in the Animal Laboratory of the State Foundation for Production and Health Research (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde), Department of Animal Production and Experimentation (Divisão de Produção e Experimentação Animal – DPEA), Brazil. Rabbits were kept in suspended individual cages to avoid their direct contact with urine and feces. They received a solid chow (Purina[®]) and water ad libitum. The rooms were temperature controlled, and the animals were kept under normal lighting, humidity, and temperature conditions. Machined grade 2 titanium implants, 2.5 mm in diameter and 6.00 mm long, with no surface treatment were manufactured especially for this study (Conexão Sistema de Próteses Ltda, São Paulo, SP, Brazil).

The animals were anesthetized and, after 10 min, the internal region of their paws was shaved with a rechargeable clipper (Oster) and cleaned with iodophor diluted in 70% v/v alcohol.

Sterilized surgical fields were placed over the animals with an opening only where the incision was going to be made. After that, 1.8 ml of 2% lidocaine and epinephrine at 1:50,000 were locally injected for vasoconstriction.

The underlying bone was exposed (medial aspect of the tibia) by displacing the periosteum with a Molt periosteum elevator, which was also used to separate and hold tissues out of the operating field.

Sequential burs were used in a logical previously established order at 800 rotations per minute (rpm) and 30 N torque. A motor and handpiece for implants were used at 16:1 rpm reduction.

The first instrument was a 2.00-mm diameter pilot drill used only to break the external cortical layer. After that, a

spiral drill, also 2.00 mm in diameter, was used to perforate bone up to the point where it touched the second cortical layer but did not perforate it. Depth was about 6 mm, that is, the exact size of the implants, which were intentionally manufactured with this length for monocortical anchorage. The third drill was used to the same depth, but its diameter was 2.3 mm (Fig. 1), which resulted in intentional lack of initial stability because the machined implants had a diameter of 2.5 mm. All perforations were made under abundant external irrigation with saline.

After the sequential drills were used, the machined implants, 2.5 mm in diameter and 6.00 mm long, were inserted with a specially designed hand driver. Once inserted, they touched the internal cortical layer but did not perforate it. They were then rotated counterclockwise for half a turn, and their placement was thus standardized: monocortical anchorage and able to rotate freely on the bone bed.

The incision was closed with a 4-0 nylon continuous suture, and two points were marked on the animal's skin to indicate where the implant was placed for the later application of laser therapy.

After surgery, the animals received the first laser application with 830 nm wavelength GaAlAs (Thera Laser/DMC Equipamentos Ltda., São Carlos, SP, Brazil) at 21.5 J/cm² on each point for 51 s. Power was 10 mW in continuous mode.

An optical fiber with a 0.02827 cm² area was used to transcutaneously irradiate 4 points around the implant, at a total dose of 86 J per application per day. The same irradiation procedure was repeated every 48 h, with a total of 7 applications.

Nonirradiated animals (control group) received mock irradiation with the laser unit switched off, and underwent the same routine as the irradiated animals. Sutures were removed at 7 d postoperatively in all groups.

On day 15, that is, 48 h after the last laser application, animals in the L1 and C1 groups were killed in a carbon-dioxide chamber. Animals in the L2 and C2 groups were killed on day 30, and those in L3 and C3 groups on day 45.

After death, the implant sites were accessed with a #11 scalpel blade; the tibia was exposed and carefully osteotomized with a safety margin of at least 20 mm on each side of the implant. The specimen was placed in a jar and fixed for



FIG. 1. Osteotomy performed with 2.3 bur.

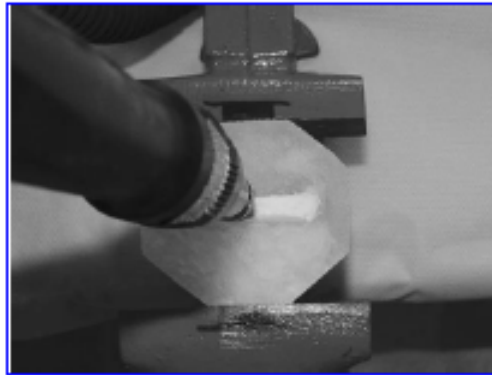


FIG. 2 Apparatus to stabilize resin blocks in axial digital torque meter (to apply counter-torque).

24 h in 10% formaldehyde. After that, specimens were embedded in chemically cured acrylic resin blocks.

For greater measurement accuracy, an apparatus was used to stabilize the resin blocks and to avoid the application of lateral forces during the trials. This apparatus also prevented the blocks from moving, minimizing the risk of fracture (Fig. 2).

Torque values were read with an axial digital torque meter that applied counter-torque (counter-rotational movement) to the implants, and peak torque values were recorded.

The torque meter display showed torque values increasing gradually from the initial application of force up to the point when it stopped. The unit automatically stored torque values at the exact moment the implant was separated from bone, that is, the maximal torque value required for rupture.

The torque meter was precalibrated at the Calibration Laboratory of the School of Engineering of Pontifícia Uni-

versidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) by using another torque meter. This laboratory belongs to the Brazilian Calibration Network and is accredited by the Brazilian Institute of Measurements, Norms and Industrial Quality (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, INMETRO).

Statistical analysis

Outcome data were recorded in tables for later evaluation and statistical analyses. The Student's *t*-test was used to calculate means and standard deviations for each group for comparisons between laser and control groups. The level of significance was set at 95%.

Results

Removal torque values for each implant were divided by groups according to treatment (with or without laser) and time points (15, 30, or 45 d). All results are shown in Table 1.

The Student's *t*-test revealed statistically significant differences ($p=0.050$) in torque values at 15 d when comparing groups C1 and L1 ($p=0.013$), as well as at 30 d when comparing groups C2 and L2 ($p=0.030$). On the other hand, results obtained in the comparison between groups C3 and L3, at 45 d, did not show statistically significant differences ($p=0.050$) in torque values ($p=0.215$).

Discussion

The use of LLLT on bone healing¹⁴⁻⁶⁸⁻¹⁰ and the development of etched surfaces¹¹⁻⁴⁶ have been increasingly investigated after studies showed significant failure rates of smooth implants when placed in maxillae with little alveolar bone ridge and, particularly, in low-quality bone (type 4).

Low bone quality and insufficient bone are the greatest challenges in treatments with implant placement. Implant characteristics, such as chemical surface, load, texture, and porosity, may influence *in vivo* bone responses.¹⁷ Surface morphology may increase implant torque removal values,¹⁶⁻²²

TABLE 1. TORQUE REMOVAL RESULTS FOR NONIRRADIATED AND IRRADIATED ANIMALS AT DIFFERENT TIME POINTS

Nonirradiated animals		Irradiated animals	
Group/Animal	Removal torque (Ncm)	Group/Animal	Removal torque (Ncm)
Group C1 (15 d)		Group L1 (15 d)	
Rabbit 1	6.6	Rabbit 16	18.3
Rabbit 2	6.3	Rabbit 17	12.4
Rabbit 3	6.9	Rabbit 18	14.7
Rabbit 4	7.4	Rabbit 19	8.9
Rabbit 5	7.9	Rabbit 20	13.8
Group C2 (30 d)		Group L2 (30 d)	
Rabbit 6	16.4	Rabbit 21	21
Rabbit 7	16.5	Rabbit 22	25.1
Rabbit 8	16.8	Rabbit 23	22.5
Rabbit 9	17.5	Rabbit 24	21.6
Rabbit 10	17.5	Rabbit 25	34
Group C3 (45 d)		Group L3 (45 d)	
Rabbit 11	23.4	Rabbit 26	36.6
Rabbit 12	24	Rabbit 27	26.2
Rabbit 13	26.2	Rabbit 28	28.3
Rabbit 14	22.5	Rabbit 29	25.4
Rabbit 15	21.4	Rabbit 30	20.5

and laser therapy may positively contribute to osteogenesis and osseointegration when applied at an early stage.^{9,10}

The results of the study by Khadra et al.²⁵ suggest a promising role for LLLT as a treatment modality for accelerating implant healing in bone. LLLT might also show a favorable effect on healing and attachment of titanium implants.

There is no standard protocol for the use of laser irradiation to improve osseointegration in implantology, and the ideal laser seems to be the one that takes radiation to the depth necessary to the treatment. In this study, we used 830 nm wavelength GaAlAs laser, according to the protocol developed by Khadra et al.²⁴

According to Dörbudač et al.,²⁶ irradiation dose affects results: very low doses may not be effective, and extremely high doses may inhibit responses.

We used machined (smooth) implants to evaluate laser therapy in situations that show reduced chances of success, such as when low-quality bone is used and implants do not have satisfactory initial stability (rotational freedom). For this reason, implants were inserted in very porous bones (rabbit tibia), could rotate freely, and were anchored to the external cortical layer only. Ivanoff et al.²⁶ and Rohner et al.²⁷ found that monocortical implants had less contact with bone, which significantly reduced their anchorage and hence yielded a poorer clinical prognosis.

In this study, laser was the only variable between groups. Therefore, it might have been responsible for the changes measured with the torque meter. Our findings confirm those reported in most studies about the biomodulation effect of laser, particularly those that focused on the initial stages of the healing process.^{24,28}

Conclusion

This study analyzed titanium implants with rotational freedom (no initial stability) inserted in the tibiae of two groups of New Zealand rabbits. After irradiating only one of the groups with GaAlAs, we concluded that a greater attachment of implants to the bone occurred at 15 and 30 d in the laser group. The mean removal torque value found in the laser group was statistically higher than in the control group (level of significance set at 95%) in the initial stages of bone healing (15 and 30 d). After 45 d, no significant difference was observed. However, long-term studies and clinical trials involving human beings should be conducted to further evaluate and confirm these experimental findings.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the Surface and Interface Research Group (CEPSI-TecnoPUCRS) for their invaluable technical assistance in the finalization of this study. The study received grants from CNPq.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Pinheiro, A.L., and Gerbi, M.E. (2006). Photoengineering of bone repair processes. *Photomed. Laser Surg.* 24, 169–178.
2. Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B., and Brånemark, P.I. (1981). A 15-year study of osseointegrated implants in the

3. treatment of the edentulous jaw. *Int. J. Oral Surg.* 10, 387–416.
3. Yang, Y., Oh, N., Liu, Y., et al. (2006). Enhancing osseointegration using surface-modified titanium implants. *J. Miner. Met. Mater. Soc.* 58, 71–76.
4. Silva Júnior, A.N., Pinheiro, A.L., Oliveira, M.G., Weismann, R., Ramalho, L.M., and Nicolau, R.A. (2007). Computerized morphometric assessment of effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 20, 83–87.
5. Nicola, R.A., Jorgetti, V., Rigau, J., Pacheco, M.T., dos Reis, L.M., and Zingaro, R.A. (2003). Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med. Sci.* 18, 89–94.
6. Merli, L.A., Santos, M.T., Genovese, W.J., and Faloppa, F. (2005). Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. *Photomed. Laser Surg.* 23, 212–215.
7. Gerbi, M.E., Pinheiro, A.L., Marzola, C., et al. (2005). Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone irradiated at 830 nm. *Photomed. Laser Surg.* 23, 382–388.
8. Weber, J.B., Pinheiro, A.L., de Oliveira, M.G., Oliveira, F.A., and Ramalho, L.M. (2006). Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. *Photomed. Laser Surg.* 24, 38–44.
9. Dörbudač, O., Haas, R., and Mailath-Pokorny, G. (2002). Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. *Clin. Oral. Implants Res.* 13, 288–292.
10. Jakse, N., Payer, M., Tangl, S., Berghold, A., Kirmeier, R., and Lorenzoni, M. (2007). Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation: an experimental study on sheep. *Clin. Oral Implants Res.* 18, 517–524.
11. Jaffe, R.A., and Benmar, C.L. (1991). The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. *J. Periodontol.* 62, 2–4.
12. Weng, D., Jackson, Z., Tamow, D., et al. (2003). A prospective multicenter clinical trial of 3i machined-surface implants: results after 6 years of follow-up. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 18, 417–423.
13. Ivanoff, C.J., Widmark, G., Johansson, C., and Wenneberg, A. (2003). Histologic evaluation of bone response to oxidized and tanned titanium micro-implants in human jawbone. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 18, 341–348.
14. Taché, A., Gau, L., Depoorter, D., and Pilliar, R.M. (2004). Effect of surface chemistry on the rate of osseointegration of sintered porous-surfaced Ti-6Al-4V implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 19, 19–29.
15. Alsaadi, G., Quirynen, M., and van Steenberghe, D. (2006). The importance of implant surface characteristics in the replacement of failed implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 21, 270–274.
16. Lu, Z.M., Schneider, G.B., Zaharias, R., Seibold, D., and Stanford, C.M. (2006). Effects of fluoride-modified titanium on osteoblast proliferation and gene expression. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 21, 203–211.
17. Park, J.M., Koak, J.Y., Jang, J.H., Han, C.H., Kim, S.K., and Heo, S.J. (2006). Osseointegration of anodized titanium implants coated with fibroblast growth factor-fibronectin (FGF-FN) fusion protein. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 21, 859–866.
18. Bornstein, M.M., Luzzi, A., Schmid, B., Buser, U.C., and Buser, D. (2003). Early loading of nonsubmerged titanium implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface

- 3-year results of a prospective study in partially edentulous patients. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 18, 659-666.
19. Oh, S., Tobin, E., Yang, Y., Carnes, D.L., Jr, and Ong, J.L. (2005). In vivo evaluation of hydroxyapatite coatings of different crystallinities. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 20, 726-731.
 20. Sul, Y.T., Johansson, C., Wernberg, A., Chu, L.R., Chang, B.S., and Albrektsson, T. (2005). Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 20, 349-359.
 21. Yamagami, A., Yoshitani, Y., and Suwa, F. (2005). Mechanical and histologic examination of titanium alloy material treated by sandblasting and anodic oxidation. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 20, 48-53.
 22. Shalabi, M.M., Wolke, J.G., and Jansen, J.A. (2006). The effects of implant surface roughness and surgical technique on implant fixation in an in vitro model. *Clin. Oral Implants Res.* 17, 172-178.
 23. Khadra, M., Renold, H.J., Lyngstadaas, S.P., Hlingsen, J.E., and Haanas, H.R. (2004). Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin. Oral Implants Res.* 15, 325-332.
 24. Khadra, M., Kasem, N., Haanas, H.R., Hlingsen, J.E., and Lyngstadaas, S.P. (2004). Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 97, 698-700.
 25. Dierbudak, O., Haas, R., and Mallath-Pokorny, G. (2003). Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin. Oral Implants Res.* 11, 540-555.
 26. Ivanoff, C.J., Sennetby, L., and Lekholm, U. (1996). Influence of mono and bicortical anchorage on the integration of titanium implants. A study in the rabbit tibia. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 25, 229-235.
 27. Rohrer, D., Meng, C.S., Huttmacher, D.W., and Tsai, K.T. (2003). Bone response to unloaded titanium implants in the fibula, iliac crest and scapula: an animal study in the Yorkshire pig. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 32, 383-389.
 28. Katz, T.I. (1987). Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE J. Quantum Electron.* 23, 1703-1017.

Address correspondence to:

Marília Gerhardt de Oliveira, Ph.D.

Av. Coronel Lucas de Oliveira, 1841/303, Petrópolis

CEP: 90460-001, Porto Alegre, RS

Brazil

E-mail: gerhardtoliveira@gmail.com



Anexos

ANEXO A



Ofício n° 02/08 – CETEA/CAV

Lages, 25 de Março de 2008.

Prezado Professor

O Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, reunido no dia 03/03/2008, aprovou o projeto de pesquisa de protocolo n° 1.04/08. Origem: Departamento de Odontologia/PUC-RS. Interessado: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli e Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes. Título: “ **Biomodulação do Laser de GaAIs no processo de incorporação óssea de aloenxertos**”.

Sem mais para o momento, agradecemos.

Atenciosamente,

Prof. Aury Nunes de Moraes
Presidente do CETEA

Aury Nunes de Moraes
Presidente do CETEA
CAV/UDESC

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli
CAV/UDESC

ANEXO B



Comissão Científica e de Ética Faculdade da Odontologia da PUCRS

Porto Alegre 13 de maio de 2009

O Projeto de: Tese

Protocolado sob n°: 0068/08
Intitulado: Análise da incorporação de aloenxerto ósseo em bloco irradiado com laser de baixa potência
Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli
Pesquisadores Associados Renato Valiati; Aury Nunes de Moraes
Nível: Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 17 de setembro de 2008.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS

Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior
 Presidente da Comissão Científica e de Ética da
 Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO C



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 199/10 – CEUA


Porto Alegre, 02 de dezembro de 2010.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 09/00112, intitulado: "**Análise da incorporação de aloenxerto ósseo em bloco irradiado com laser de baixa potência**".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,


Profa. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Rogerio Miranda Pagnoncelli
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br