

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

JEFFERSON VIAPIANA PAES

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA INCORPORAÇÃO  
DE ALOENXERTO ÓSSEO TRITURADO**

PORTO ALEGRE – RS

2012

JEFFERSON VIAPIANA PAES

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA INCORPORAÇÃO  
DE ALOENXERTO ÓSSEO TRITURADO**

Tese apresentada como requisito parcial 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.

Orientadora:  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Marília Gerhardt de Oliveira

PORTO ALEGRE - RS

2012

**P126e** Paes, Jefferson Viapiana  
Efeitos do laser de baixa potência na incorporação de aloenxerto ósseo triturado. / Jefferson Viapiana Paes. – Porto Alegre, 2012.  
111 f. : il.

Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) – Faculdade de Odontologia, PUCRS.  
Orientação: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marília Gerhardt de Oliveira.

1. Odontologia. 2. Cirurgia Bucomaxilofacial. 3. Transplante Homólogo. 4. Terapia a Laser de Baixa Intensidade.  
5. Criopreservação. I. Oliveira, Marília Gerhardt de. II. Título.

**CDD 617.52**

**Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária:  
Cíntia Borges Greff - CRB 10/1437**



*Dedicatória*

---

## DEDICATÓRIA

### *À Deus*

Desde o início de minha caminhada, Tu estavas comigo. Dias, noites e viagens se passaram. Vitórias foram conquistadas. Derrotas foram superadas. conhecimentos foram adquiridos... E agora, olho para as minhas mãos. Descubro nelas a leveza perfeita para alcançar o detalhe. A força exata para intervir na dor. A mobilidade necessária para atingir o mais difícil. A sensibilidade que percebe o que não pode ser dito. Abro-me para o sorriso. Descubro nele a perfeição que faz de minhas mãos um instrumento de Deus. A simplicidade que torna simples o mais difícil. A sensibilidade que me diz tudo, sem nada dizer. Gestos, sorrisos, expressões, que unem o dom e desejo, auxílio e agradecimento, cirurgia e arte. Alcancei os meus objetivos, e vim Te louvar, Te agradecer e Te oferecer Humildemente a vida, o amor, a felicidade, enfim, a vitória deste momento.

“Você se fez presente em todos os momentos firmes e trêmulos. E, passo a passo, pude sentir sua mão na minha, transmitindo-me a segurança necessária para enfrentar meu caminho a seguir... A presença é qualquer coisa como a luz e a vida, e sinto que, em meu gesto, existe o Teu gesto e em minha voz, a Tua voz.”

*(Vinícius de Moraes)*

Aos coelhos "animaizinhos inofensivos", enviados por Deus, que involuntariamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

Obrigado Senhor.

À **Franciana**,

minha esposa, eterna amada esta titulação é mais tua do que minha, pois sem seu amor, paciência, apoio, cumplicidade, auxílio, compreensão... eu nada seria. Fran, você é minha luz, estrada meu caminho, sem você não sei andar sozinho, sou tão dependente de você...Deus logo nos dará a benção de ser pai e mãe.

Ao Prof. Dr. **Rogério Miranda Pagnoncelli** o meu agradecimento, por guiar-me no Mestrado, Doutorado e na vida, sempre acreditando e confiando em mim... Alguns são homens, outros professores e poucos são mestres; os primeiros respeita-se, os professores escuta-se e os últimos segue-se, obrigado Mestre.

Ao Prof. Dr. **Renato Valiati**, por sempre mostrar o melhor caminho a seguir. Agradeço especialmente à você meu ex-professor de graduação e especialização, colega de pós-graduação, sócio, mentor, mais que amigo, irmão e “dindo”.

Aos meus pais **Luis Ademar e Tarcila**

Sem perder a esperança de que o mundo seria melhor, me ensinaram a viver com dignidade e iluminaram os caminhos obscuros com amor e dedicação para que eu trilhasse sem medo. Neste momento tão especial, procurei entre as palavras aquela que melhor expressasse esta emoção, e só encontrei uma: OBRIGADO! “*Que Deus te abençoe Pai, que Deus te abençoe Mãe. Amo vocês!*”

Ao *Carlos Alberto Medeiros Martins* e a *Camila Araldi*, que me acolheram com muito carinho em Porto Alegre e se transformaram na minha família. Eu e a Fran, seremos eternamente gratos por tudo.

A minha irmã *Silamara*, que sempre apoiou e torceu muito por mim; mais que uma irmã uma grande amiga. A meus irmãos *Marcos Tarcísio* e *Luis Aurélio*, cuja valentia, astúcia e garra eu orgulhosamente admiro.

A meus sobrinhos *Maria Eduarda*, *Isaac*, *Isabella* e *Luisa* a pureza de seus coraçõezinhos me dá forças para lutar por um mundo melhor.

Aos *Familiares*, meus cunhados *Carlos Henrique*, *Roberta*, *Francieli* e *Francine*, meus sogros *Francisco* e *Eliana* (*apesar de colorados, moram no coração deste gremista...*), pessoas de caráter ímpar, exemplos profissionais e pessoais. Demais familiares, que direta ou indiretamente contribuíram para eu tornar-me uma pessoa melhor.



*Agradecimentos*

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha Orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Gerhardt de Oliveira** pelo apoio, atenção, confiança, paciência, compreensão e carinho dedicados... Pelo exemplo de pessoa e profissional, sempre dedicada a Odontologia e Área da Saúde, muito obrigado professora.

Aos coorientadores **Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli, Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes e 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**.

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 Tiffany C. E. da Silva**, pelo auxílio na confecção das lâminas histológicas.

Ao **Centro de Microscopia e Microanálises (CEMM)** da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS) especialmente a **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Berenice Anina Dedavid**, as técnicas **Miriam e Natália** que nos permitiram cursos do MEV, aprendizado e confecção de material para a pesquisa.

Ao Prof. Dr. **João Feliz Duarte de Moraes**, pelo apoio e orientação com a bioestatística no Mestrado e no Doutorado.

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

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

A **Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC)** que me permitiu aprender com a docência.

Ao **CNPq** por viabilizar recursos para a realização deste Curso de Doutorado em Odontologia, área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Ao **Prof. Dr. Jose Antônio Poli de Figueiredo**, coordenador do programa de Pós-graduação em Odontologia, pela dedicação ao curso.

Aos meus colegas e amigos de curso **Beatriz Farias Vogt, Diego Blaya, Fabiano Azambuja e Marcelo Vanucci** agradeço pelo incentivo e companheirismo neste período em que convivemos em Porto Alegre.



*Resumo*

---

## RESUMO

**Objetivo:** devido ao aumento da utilização de aloenxertos ósseos nas reabilitações orais avaliou-se o efeito do laser não ablativo no processo de incorporação óssea de aloenxertos triturados. As pesquisas publicadas demonstram que aplicação da laserterapia não ablativa (LLLT) apresenta vantagens no reparo tecidual e no processo de neoformação óssea. **Materiais e Métodos:** foram utilizados quatro coelhos como doadores do tecido ósseo e realizados aloenxertos e autoenxertos triturados na calvária de 20 coelhos divididos em quatro grupos: dois grupos com LLLT (aloenxerto, autoenxerto e coágulo sanguíneo) e outros dois grupos controle (aloenxerto, autoenxerto e coágulo sanguíneo) sem irradiação. Os animais foram mortos com 35 dias (n=10) e 70 dias (n=10). Os parâmetros de energia empregados foram: aplicação de laser de diodo (AsGaAl), comprimento de onda de 830 nm de 4 J/cm<sup>2</sup> em quatro pontos da calota craniana perfazendo um total de 16 J/cm<sup>2</sup> por aplicação. A dose total do tratamento após as oito aplicações foi de 128 J/cm<sup>2</sup>. **Resultados:** houve um aumento da deposição de fibras colágenas, da remodelação óssea, vascularização e um menor infiltrado inflamatório nos grupos irradiados nos aloenxertos aos 35 dias quando comparado ao grupo controle alógeno. Aos 70 dias houve uma maior deposição de fibras colágenas e maior preenchimento das lacunas osteocíticas e foi observado diferença estatística significativa na remodelação óssea e na vascularização quando comparado ao grupo controle alógeno. Os grupos de autoenxerto com LLLT apresentaram maior preenchimento das lacunas osteocíticas, maior deposição de fibras colágenas e maior remodelação óssea aos 35 e 70 dias. **Conclusão:** Observou-se através da Microscopia Óptica e de MEV um efeito positivo qualitativo e quantitativo da LLLT, acelerando o processo de osteogênese, incorporação e remodelação de aloenxertos e autoenxertos ósseos triturados.

**Descritores**<sup>1</sup>: Transplante Homólogo. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. Criopreservação.

---

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



*Abstract*

---

## ABSTRACT

**Objective:** As the use of bone allografts in oral rehabilitation has increased, this study evaluated the effect of non-ablative laser on bone apposition when ground bone allografts are used. Studies in the literature show that the application of low-level laser therapy (LLLT) promotes tissue repair and new bone formation. **Material and Methods:** Four rabbits were used as bone donors, and ground bone allografts and autografts were implanted in the skull of 20 rabbits divided into four groups: two LLLT groups (allograft, autograft and blood clot), and two control groups (allograft, autograft and blood clot) that did not receive LLLT. The animals were killed at 35 (n=10) and 70 (n=10) days. Laser parameters were: laser diode application (GaAlAs), wavelength of 830 nm of 4 J/cm<sup>2</sup> at four points in the skullcap at a total of 16 J/cm<sup>2</sup> per application. Total treatment dose after eight applications was 128 J/cm<sup>2</sup>. **Results:** There was an increase in the apposition of collagen fibers, bone remodeling and vascularization, and there was less inflammatory infiltrate in the LLLT groups that received allografts at 35 days than in the allograft control group. At 70 days there was greater collagen fiber apposition, greater density of osteocytes lacunae, and a statistically significant difference in bone remodeling and vascularization when compared with the allograft control group. In the LLLT autograft groups, there was also greater density of osteocytes lacunae, greater apposition of collagen fibers and greater bone remodeling at 35 and 70 days. **Conclusion:** Evaluation under light microscopy and SEM revealed a positive qualitative and quantitative effect of LLLT, which accelerated osteogenesis and the incorporation and remodeling of ground bone allografts and autografts.

**Keywords<sup>2</sup>:** Transplantation, Homologous. Laser Therapy, Low-Level. Cryopreservation.

---

<sup>2</sup> Descritores em Ciências da Saúde (DeCS); disponível em: <<http://decs.bvs.br/>>.



*Lista de Figuras*

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Incisão Sobre a Sutura Sagital e Centro do Frontal .....	60
Figura 2: Dissecção dos Tecidos Moles com Descolador Freer.....	60
Figura 3: Osteotomia para a Retirada dos Blocos da Calota Craniana.....	61
Figura 4: Enxerto Ósseo Sendo Retirado Mantendo a Integridade da Dura-Máter e do Cérebro .....	62
Figura 5: Calota Craniana de Coelho Doador, após a Retirada dos Seis Blocos Ósseos .....	63
Figura 6: <b>a)</b> Triturador Ósseo e Cuba com S.F 0,9% com Blocos Ósseos Submersos; <b>b)</b> Lâmina do Triturador Ósseo e Osso Triturado .....	64
Figura 7: <b>1)</b> Enxerto Triturado Autógeno; <b>2)</b> Alógeno e <b>3)</b> Controle Negativo.....	65
Figura 8: <b>a)</b> Grupo Laser de Aloenxerto Ósseo Triturado de 35 dias; <b>b)</b> Grupo Controle de Aloenxerto Ósseo Triturado de 35 dias. <b>1)</b> Osso Receptor, Medula Óssea Normal; <b>2)</b> Área Enxertada; <b>3)</b> Remodelação Óssea; <b>4)</b> Infiltrado Inflamatório. H&E Objetiva 4X .....	72
Figura 9: <b>a)</b> Grupo Laser de Aloenxerto Ósseo Triturado de 70 dias; <b>b)</b> Grupo Controle de Aloenxerto Ósseo Triturado de 70 dias. <b>1)</b> Osso Receptor, Medula Óssea Normal; <b>2)</b> Área enxertada; <b>3)</b> Proliferação de Fibras Colágenas; <b>Seta:</b> Lacunas Ósseas Vazias; <b>Cabeça de Seta:</b> Lacunas Ósseas Preenchidas. H&E objetiva 4X.....	73
Figura 10: <b>a)</b> Grupo Laser de Autoenxerto Ósseo Triturado de 35 dias; <b>b)</b> Grupo Controle de Autoenxerto ósseo Triturado de 35 dias. <b>1)</b> Osso Receptor, Medula óssea normal; <b>2)</b> Área Enxertada; <b>3)</b> Proliferação de Fibras Colágenas. <b>Seta:</b> Lacunas Ósseas Vazias; <b>Cabeça de Seta:</b> Lacunas Ósseas Preenchidas. H&E Objetiva 4X.....	75
Figura 11: <b>a)</b> Grupo Laser de Autoenxerto Ósseo Triturado de 70 dias; <b>b)</b> Grupo Controle de Autoenxerto Ósseo Triturado de 70 dias. <b>1)</b> Osso Receptor, Medula Óssea Normal; <b>2)</b> Área Enxertada; <b>3)</b> Proliferação de Fibras Colágenas; <b>Seta:</b> Lacunas Ósseas Vazias; <b>Cabeça de seta:</b> Lacunas ósseas preenchidas. H&E Objetiva 4X.....	76
Figura 12: <b>a)</b> Imagem MEV 26X modo SE; <b>b)</b> detalhe em 45X da Imagem (a); <b>c)</b> Imagem H&E Objetiva 4X; <b>d)</b> Imagem MEV 500X, Área de União entre Enxerto e Osso Receptor; <b>e)</b> Imagem MEV 45X modo BSE, medindo Partículas de Enxerto. Grupo Laser de Aloenxerto Ósseo Triturado com 35 dias.....	79

Figura 13: <b>a)</b> Imagem MEV 45X modo SE; <b>b)</b> Imagem H&E Objetiva 4X; <b>c)</b> Imagem MEV 500X, Área de União entre Enxerto e Osso Receptor. Grupo Controle de Aloenxerto Ósseo Triturado com 35 dias .....	80
Figura 14: <b>a)</b> Imagem MEV 26X modo SE e Imagens; <b>b); c) e d)</b> Detalhe em 45X, 250X e 500X respectivamente da Imagem (a); <b>e)</b> Imagem H&E Objetiva 10X. Grupo Laser de Aloenxerto Ósseo Triturado com 70 dias .....	81
Figura 15: <b>a)</b> Imagem MEV 45X modo SE e <b>b)</b> Detalhe 500X da Imagem (a). Imagem H&E Objetiva 4X; <b>c)</b> Imagem MEV 500X. Grupo Controle de Aloenxerto Ósseo Triturado com 70 dias .....	82
Figura 16: <b>a)</b> Imagem MEV 26X modo SE; <b>b) e c)</b> Detalhe 45X e 500X respectivamente da Imagem (a); <b>d)</b> Imagem H&E Objetiva 4X. Grupo Laser de Autoenxerto Ósseo Triturado com 35 dias .....	83
Figura 17: <b>a)</b> Imagem MEV 26X modo SE; <b>b) e c)</b> Detalhe 45X e 500X respectivamente da Imagem (a); <b>d)</b> Imagem H&E Objetiva 10X. Grupo Controle de Autoenxerto Ósseo Triturado com 35 dias .....	84
Figura 18: <b>a)</b> Imagem MEV 26X modo SE; <b>b)</b> Imagem H&E Objetiva 4X; <b>c)</b> Imagem MEV 500X modo SE; <b>d)</b> Imagem H&E Objetiva 10X. Grupo Laser de Autoenxerto Ósseo Triturado com 70 dias .....	85
Figura 19: <b>a)</b> Imagem MEV 45X modo SE; <b>b)</b> Imagem H&E Objetiva 4X; <b>c)</b> Imagem MEV 500X modo SE; <b>d)</b> Imagem H&E Objetiva 10X. Grupo Controle de Autoenxerto Ósseo Triturado com 70 dias .....	86
Figura 20: <b>a) e b)</b> Imagem H&E Objetiva 4X; <b>c)</b> Imagem MEV 45X modo SE. Grupo Laser Coágulo Sanguíneo com 35 dias.....	86
Figura 21: <b>a) e b)</b> Imagem H&E Objetiva 4X; <b>c)</b> Imagem MEV 45X modo SE. Grupo Controle Coágulo Sanguíneo com 35 dias .....	87
Figura 22: <b>a) e b)</b> Imagem H&E Objetiva 4X; <b>c)</b> Imagem MEV 45X modo SE. Grupo Laser Coágulo Sanguíneo com 70 dias.....	87
Figura 23: <b>a) e b)</b> Imagem H&E Objetiva 4X; <b>c)</b> Imagem MEV 45X modo SE. Grupo Controle Coágulo Sanguíneo com 70 dias .....	87



## *Lista de Tabelas*

---

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Organização dos Grupos Experimentais.....	58
Tabela 2: Critérios Quali-Quantitativos Utilizados para Análise de Microscopia Óptica .....	68
Tabela 3: Grupo Controle (C 35d) e Grupo Laser (L 35d) de Aloenxerto Ósseo Triturado de 35 dias .....	72
Tabela 4: Grupo Controle (C 70d) e Grupo Laser (L 70d) de Aloenxerto Ósseo Triturado de 70 dias .....	73
Tabela 5: Análise Estatística pelo Teste de Mann-Whitney do Grupo Laser e Grupo Controle de Aloenxerto Ósseo Triturado de 70 dias .....	74
Tabela 6: Grupo Laser (L 35d) e Grupo Controle (C 35d) de Autoenxerto Ósseo Triturado de 35 dias .....	75
Tabela 7: Grupo de Autoenxerto Ósseo Triturado com 70 dias Grupo Controle (C auto 70) e com Laserterapia (L auto 70).....	76
Tabela 8: Grupo Controle (Coágulo C 35) e Grupo Laser (Coágulo L 35) e de Coágulo Sanguíneo 35 dias .....	77
Tabela 9: Grupo Controle (Coágulo C 70) e Grupo Laser (Coágulo L 70) de Coágulo Sanguíneo 70 dias .....	78



*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
BMPs	-	Bone Morphogenetic Proteins
BSE	-	Elétrons Retroespalhados (Backscattering Electrons)
C	-	Controle
CEP	-	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	-	Comitê de Ética para o uso de Animais
cm	-	Centímetro
cm <sup>2</sup>	-	Centímetro quadrado
COBEA	-	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
$\lambda$	-	Comprimento de Onda
CTBMF	-	Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
GBR	-	Guided Bone Regeneration (Regeneração Óssea Guiada)
°C	-	Graus Centígrados
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	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 <sup>2</sup>	-	Joule por centímetro quadrado
Kg	-	Quilograma
L	-	Laser
LLLT	-	Low Level Laser Therapy (Terapia a Laser de Baixa Intensidade)
mg	-	Miligrama
mm	-	Milímetro
mW	-	MiliWatt
n	-	Número
n <sup>o</sup>	-	Número
N	-	Newton

nm	-	Nanômetro
PDGF	-	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
Ph	-	Potencial Hidrogeniônico
®	-	Registrado
PRP	-	Plasma Rico em Plaquetas
%	-	Porcentagem
PUCRS	-	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RPM	-	Rotações por Minuto
SE	-	Elétrons Secundários (Secondary Electrons)
TGF- $\beta$	-	Fator de Transformação do Crescimento Beta
UDESC	-	Universidade do Estado de Santa Catarina
UNIPLAC	-	Universidade do Planalto Catarinense
X	-	Vezes



## *Sumário*

---

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2 REVISTA DE LITERATURA .....</b>	<b>28</b>
2.1 ENXERTO ÓSSEO .....	28
<b>2.1.1 O Processo de Incorporação dos Enxertos Ósseos .....</b>	<b>31</b>
2.2 ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO.....	33
2.3 ENXERTO ÓSSEO ALÓGENO.....	34
<b>2.3.1 Processamento do Aloenxerto Ósseo .....</b>	<b>36</b>
<u>2.3.1.1 Portaria do Ministério de Estado da Saúde.....</u>	<u>38</u>
2.4 ENXERTO ÓSSEO TRITURADO E EM BLOCO .....	38
2.5 LASERTERAPIA.....	41
<b>2.5.1 Aplicações Clínicas .....</b>	<b>41</b>
<b>2.5.2 Efeitos da Laserterapia na Osteogênese .....</b>	<b>41</b>
<b>2.5.3 Estudos Sobre Laserterapia na Regeneração Óssea .....</b>	<b>44</b>
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>55</b>
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	55
3.2 CARACTERIZAÇÃO.....	55
3.3 MODELO ANIMAL E ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	55
<b>3.3.1 Coelhos Doadores dos Enxertos Ósseos.....</b>	<b>56</b>
<b>3.3.2 Coelhos Receptores dos Enxertos Ósseos Triturados .....</b>	<b>57</b>
3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO NOS ANIMAIS DOADORES.....	58
3.5 PROTOCOLO LASERTERAPIA NÃO ABLATIVA.....	66
3.6 MORTE DOS ANIMAIS E REMOÇÃO DAS AMOSTRAS.....	66
3.7 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS E DE ANÁLISE.....	66
3.8 ANÁLISE DOS ENXERTOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	67
3.9 ANÁLISE DOS ENXERTOS POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	67
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENXERTOS.....	69
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>71</b>

4.1 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DESCRITIVA E QUANTITATIVA POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	71
4.1.1 Grupo Laser (Figura 8a) e Grupo Controle (Figura 8b) de Aloenxerto Ósseo Triturado de 35 dias (Tabela 3).....	71
4.1.2 Grupo Laser (Figura 9a) e Grupo Controle (Figura 9b) de Aloenxerto Ósseo Triturado de 70 dias (Tabelas 4 e 5).....	72
4.1.3 Grupo Laser (Figura 10a) e Grupo Controle (Figura 10b) de Autoenxerto Ósseo Triturado de 35 dias (Tabela6).....	74
4.1.4 Grupo Laser (Figura 11a) e Grupo Controle (Figura 11b) de Autoenxerto Ósseo Triturado com 70 dias (Tabela7).....	75
4.1.5 Grupo Controle e Grupo Laser de Coágulo Sanguíneo de 35 e 70 dias (Tabelas 8 e 9).....	77
4.2 AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DOS ENXERTOS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E MICROSCOPIA ÓPTICA.....	78
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (UDESC).....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO PARA EXECUÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA (UDESC).....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO C – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PUCRS.....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXO D - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS (PUCRS).....</b>	<b>111</b>



## *Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

Dependendo do grau e severidade em que se encontra a cavidade bucal, a reabilitação torna-se um grande desafio ao cirurgião dentista tanto do ponto de vista técnico quanto da exigência imposta pelo paciente, por resultados cada vez mais funcionais e estéticos.

O objetivo maior da Odontologia atualmente é restaurar a função e o conforto, onde uma série de recursos vem sendo utilizados para atingir os melhores resultados, e propiciar um bom perfil facial e um sorriso harmônico, com oclusão estável, fonética adequada, sem causar danos ou sobrecargas ao sistema estomatognático<sup>1</sup>.

A recuperação de perdas ósseas, que podem ser ocasionadas por traumas, procedimentos cirúrgicos ou por processos patológicos, é um desafio para a Odontologia<sup>2</sup>. Uma preocupação é a ocorrência de perdas ósseas principalmente após exodontias e fibroses onde deveria existir tecido ósseo<sup>1</sup>.

A reabsorção que se segue à exodontia muitas vezes compromete o volume ósseo remanescente, impedindo a instalação de implantes. Por essa razão, a reconstrução óssea é necessária, para permitir a posterior colocação de implantes em posição proteticamente adequada<sup>3</sup>.

O osso é o mais comum tipo de enxerto utilizado em Implantodontia, em cirurgia protética, no tratamento de defeitos congênitos e em procedimentos reconstrutivo dos maxilares<sup>4</sup>.

Devido aos inconvenientes da remoção do osso autógeno, como a morbidade de uma segunda área cirúrgica para a remoção do enxerto e disponibilidade limitadas, é crescente o interesse por materiais alternativos<sup>5,6</sup>. O osso alógeno, também denominado homogêneo, obtido de um doador, surge como uma alternativa<sup>7</sup>. Com o advento dos bancos de tecidos e a ampliação e melhora das técnicas de preservação, é maior a disponibilidade dos enxertos alógenos<sup>8</sup>, facilitando a utilização em cirurgias de reconstrução e Implantodontia.

A presença de tecido neoformado nas biópsias realizadas, há sugestão de remodelação óssea verificada radiograficamente, há ausência de relatos de reações adversas e o acompanhamento das próteses sobre os implantes colocados até três anos, sugerem que o osso alógeno e implantes de titânio podem ser usados na reconstrução de maxilas e levantamento de seios maxilares extremamente reabsorvidas sem reações imunológicas indesejáveis e com grande segurança<sup>9-12</sup>.

Com a evolução da Odontologia e do desenvolvimento tecnológico, a laserterapia (LLLT) vem ocupando o seu espaço perante os tratamentos odontológicos em cirurgia bucal.

O laser vem sendo estudado desde a década de 60, e quando operado com baixa intensidade visa sua ação terapêutica sobre os diferentes tecidos biológicos, através da biomodulação, principalmente por seus efeitos na reparação tecidual, melhorando a regeneração e cicatrização dos tecidos.

Estudos têm evidenciado efeitos positivos da LLLT sobre o processo de reparo de feridas de tecidos moles, porém os seus efeitos sobre tecidos ósseos ainda são poucos conhecidos<sup>2</sup>.

O uso da LLLT como adjuvante na incorporação do enxerto de osso alógeno na área receptora teoricamente irá acelerar o processo de incorporação e diminuir a resposta inflamatória inicial podendo assim aumentar a revascularização e conseqüentemente o sucesso clínico<sup>13</sup>.

Partindo do pressuposto das vantagens da LLLT na área da saúde, na reparação tecidual e aceleração dos processos de neoformação óssea, e no crescente aumento do uso de enxertos ósseos alógenos triturados na clínica de reconstrução alveolar, principalmente para a reabilitação implantológica, surgiu o interesse em avaliar os efeitos da LLLT de baixa potência na incorporação de aloenxertos ósseos triturados, realizados em dois períodos distintos de cicatrização. Investigando os efeitos da biomodulação na deposição de fibras colágenas, na remodelação óssea, no preenchimento das lacunas osteocíticas, na incorporação do enxerto, o infiltrado inflamatório e a vascularização.

Devido ao aumento da utilização de aloenxertos ósseos nas reabilitações bucais e as vantagens do uso do laser, esta pesquisa tem por objetivo descrever os efeitos da LLLT no processo de incorporação óssea de aloenxertos triturados processados por congelamento profundo implantados em calvárias de coelhos.



*Revista de Literatura*

---

## 2 REVISTA DE LITERATURA

### 2.1 ENXERTO 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<sup>14</sup>.

Ollier (1867 apud MISCH, 2006)<sup>15</sup> relatou a transferência de osso e perióstio e, pela osteogênese que observou no enxerto, concluiu que ambos estavam vivos. No entanto, Barth (1893 apud MISCH, 2006)<sup>15</sup> foi o primeiro a discordar dessa conclusão. Seus estudos revelaram que o enxerto ósseo estava completamente morto vários dias após sua transferência, e que somente através de um gradual processo de invasão por células oriundas do osso receptor havia repovoamento com células vivas. Esse processo, hoje, é convencionalmente denominado de osteocondução (BARTH, 1893 apud MISCH, 2006)<sup>15</sup>.

Albrektsson (1980 apud LEVANDOWSKI et al., 2008)<sup>16</sup> cita que as áreas doadoras de osso para a região oral podem ser o mento e a região retromolar, para quantidades menores de osso. Para quantidades maiores de osso, recomenda a crista ilíaca, a calota craniana, a costela e a tíbia. Adell (1974 apud LEVANDOWSKI et al., 2008)<sup>16</sup> e Breine e Branemark (1980 apud LEVANDOWSKI et al., 2008)<sup>16</sup> foram os primeiros a estudar a utilização de enxertos ósseos autógenos com implantes de titânio (endósseo) em maxilas extremamente atroficas. No entanto, são importantes o diagnóstico inicial e o planejamento pré-operatório para a colocação de implantes, sendo necessário analisar o espaço e a relação intermaxilar. Harakas (1984 apud LEVANDOWSKI et al., 2008)<sup>16</sup> descreveu a presença de uma proteína (BMP) presente em todos os enxertos, seja com vitalidade ou desvitalizada, e que estimula a formação do novo osso. Diante da crescente utilização de implantes osseointegrados para reabilitação oral, as dificuldades foram surgindo junto com a necessidade de corrigir os defeitos ósseos grandes, médios ou pequenos, e com o passar do tempo, o enxerto ósseo começou a ser mais usado em função do sucesso clínico do procedimento, muito embora houvesse discussão e opiniões contrárias quanto ao aspecto biológico e reparacional dos enxertos<sup>16</sup>.

A avaliação da Tomografia Computadorizada, demonstrou que a borda que separa o enxerto do tecido ósseo receptor se torna menos nítida a partir de 6 a 8 semanas, o que indica a simultânea reabsorção do enxerto e uma gradual substituição por novo osso. Entre 6 a 12 meses após a cirurgia, os enxertos não podem mais ser identificados como entidades separadas. Isto parece indicar a completa incorporação do enxerto<sup>17</sup>.

No entanto o seu sucesso depende de uma quantidade mínima de tecido ósseo para a inserção do implante, visto que, depois da perda dos dentes, o processo alveolar maxilar sofre progressiva e irreversível reabsorção, que resulta numa grande perda de substância, tanto vertical quanto horizontal podendo atingir um estágio de pneumatização do seio maxilar, o que contra-indica a instalação de implantes osseointegráveis porque exige rebordo alveolar com espessura mínima de 5mm e altura de 10mm<sup>18</sup>.

Dentre as principais queixas dos pacientes edentados estão o desconforto pelo uso de próteses removíveis, o volume, o comprometimento estético, a deficiência na função mastigatória e a influência na sua vida sócio-cultural. Por isso os implantes dentais vêm se destacando como excelente e promissor método terapêutico para se obter uma adequada reabilitação bucal em pacientes edêntulos totais e parciais posteriores minimizando estes aspectos negativos<sup>19</sup>.

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 é utilizado em aproximadamente 60% dos enxertos ósseos em 1996, comparado com 34% de aloenxertos e 7% de outros materiais<sup>20</sup>.

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<sup>21</sup>. 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<sup>22</sup>.

Os mecanismos biológicos que formam o princípio básico para os enxertos ósseos incluem três processos básicos: osteogênese, osteoindução e osteocondução. A osteogênese ocorre quando os osteoblastos e células viáveis são transplantados como material de enxerto para dentro do defeito, onde podem estabelecer centro de formação óssea<sup>15</sup>. O único material

de enxerto disponível com propriedades osteogênicas é o enxerto ósseo autógeno, sendo o osso esponjoso sua forma mais eficaz, que fornece a maior concentração de células ósseas<sup>23</sup>.

O enxerto alógeno é considerado essencialmente osteocondutor, propiciando uma estrutura para migração de células, possuindo proteínas morfogenéticas ósseas, que são expressas após a desmineralização durante remodelação do osso humano<sup>24</sup>.

Dois requisitos são muito importantes para que ocorra a formação óssea com êxito: irrigação sanguínea e estabilidade mecânica. Estes fatores são extremamente dependentes do cirurgião e acentuam a importância da correta abordagem cirúrgica e do preparo do leito receptor<sup>25</sup>. 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<sup>26-28</sup>.

A extensão da formação de um novo osso entre o enxerto e a junção do leito receptor está correlacionada à revascularização e ao tempo de cicatrização<sup>29</sup>.

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<sup>25</sup>.

A propriedade de osteoindução tem sido atribuída às proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) e fatores de crescimento, que fazem parte do componente colágeno do osso que é mantido intacto durante o congelamento ósseo na temperatura de  $-85^{\circ}\text{C}$ <sup>8,30</sup>.

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-B, que estão associadas com o colágeno componente do osso<sup>30</sup>.

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 sítio doador e o volume limitado, tem estimulado a pesquisa por materiais substitutos ao osso autógeno<sup>31-32</sup>.

### 2.1.1 O Processo de Incorporação dos Enxertos Ósseos

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<sup>33</sup>.

Teremos no mesmo enxerto 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. Áreas de neoformação 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<sup>27,34</sup>.

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<sup>26,35</sup>.

Ocorre um processo inflamatório inicial e um aumento da atividade vascular na região receptora imediatamente após a colocação do enxerto<sup>8,22,30,34</sup>, mediados por fatores de crescimento e indutores, principalmente o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento de transformação  $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>8,36,37</sup>. O papel das plaquetas como a maior fonte de PDGF ressalta a importância do coágulo sanguíneo na regeneração óssea<sup>8,26,35</sup>.

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<sup>27-28</sup>. A remodelação geralmente está restrita a apenas dois a seis milímetros na interface enxerto-hospedeiro<sup>28</sup>.

A partir deste momento o enxerto progride para um osso maduro e funcional, através de um ciclo normal de reabsorção e aposição óssea<sup>26,36</sup>.

Após a revascularização do enxerto e reparo quase completo da área, que ocorre por volta da 4ª semana, os macrófagos dão lugar aos osteoblastos<sup>36</sup>, numa cascata mediada por outros fatores químicos<sup>26,35</sup>. 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<sup>26,36</sup>.

Um fator primordial é o íntimo contato do enxerto com o tecido vascularizado do hospedeiro para determinar a incorporação<sup>30</sup>. Os espaços entre os fragmentos inibem a passagem dos sinais moleculares e a criação de uma estrutura osteocondutiva<sup>26</sup>. 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<sup>25,38</sup>.

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<sup>34</sup>. 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<sup>30</sup>.

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<sup>28,35,34</sup> 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<sup>17</sup>. O osso alógeno parece agir mais como uma matriz mineral, que fornece suporte para a migração e proliferação celular<sup>30</sup>.

No interior do enxerto autógeno, as células que não foram mantidas pela difusão de nutrientes através de adequada revascularização, apresentam necrose<sup>30</sup>. 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<sup>26,30,35</sup>. 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)<sup>36,37</sup>.

Se os fatores de crescimento não fossem ativados, um aloenxerto ósseo não teria vantagem biológica sobre um substituto ósseo sintético<sup>39</sup>. 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<sup>40</sup>.

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. Com o aloenxerto a formação de novo osso ocorre primeiramente abaixo do periósteo e na interface entre o enxerto e o hospedeiro. Os enxertos ósseos e os materiais substitutos de enxertos deveriam ser avaliados através da histologia para definir a biocompatibilidade e as propriedades bioativas<sup>41</sup>.

## 2.2 ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO

O enxerto cortical autógeno, não permite difusão suficiente para sustentar a sobrevivência de nenhuma fração de osteócitos viáveis após o procedimento, e portanto estes segmentos não são realmente osteogênicos, mas provêm um substrato osteocondutivo para a formação de osso pelo hospedeiro<sup>27</sup>.

O osso autógeno medular é tido como o único enxerto livre realmente *osteogênico*, ou seja, carrega um componente celular, formado principalmente por osteoblastos, e assegura uma rápida incorporação do enxerto ao leito receptor<sup>42</sup>, mas possui fracas propriedades mecânicas iniciais<sup>26,35</sup>.

Para reconstruir um defeito ósseo alveolar severo o osso autógeno é a primeira opção (*gold standard*) por oferecer maior previsibilidade de resultado, não transmitir doenças e oferecer completa histocompatibilidade<sup>7,26,35,43-45</sup>.

O osso cortical autógeno é densamente mineralizado, pouco vascularizado e possui pequena quantidade celular<sup>38</sup>. O enxerto autógeno 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<sup>27</sup>. As principais áreas doadoras da região intra-oral (mento e ramo de mandíbula) são predominantemente formadas por osso cortical<sup>22</sup>. Alguns autores, como Bauer e Muschler (2000)<sup>27</sup>; Vaccaro (2002)<sup>43</sup>, salientam que mesmo no osso autógeno, a maioria das células viáveis da região doadora necrosam ao serem separadas do suprimento sanguíneo e processadas no leito cirúrgico.

O osso autógeno medular é tido como o único enxerto livre realmente *osteogênico*, ou seja, carrega um componente celular, formado principalmente por osteoblastos, e assegura uma rápida incorporação do enxerto ao leito receptor<sup>42</sup>, mas possui fracas propriedades mecânicas iniciais<sup>16,26,35</sup>.

### 2.3 ENXERTO ÓSSEO ALÓGENO

Durante os primeiros cem anos (1880-1980) de uso de enxertos alógenos, o maior problema encontrado era a disponibilidade, pois não havia legislação que protegesse o processamento e os doadores. 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<sup>46</sup>.

Através de acompanhamento por testes enzimáticos, foi demonstrado que os enxertos alógenos são fracamente imunogênicos, desde que todo o tecido mole circundante e o osso medular sejam removidos<sup>21</sup>.

Segundo a American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) 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<sup>47</sup>.

Se os fatores de crescimento não fossem ativados, um aloenxerto ósseo não teria vantagem biológica sobre um substituto ósseo sintético<sup>39</sup>. Os aloenxertos ósseos são usados nas cirurgias reconstrutivas não só por suas propriedades osteoindutoras, mas principalmente as osteocondutoras. Assim, o arcabouço mineral ósseo preservado dos enxertos será preenchido por osteoblastos do receptor. Logo, a perda da viabilidade celular demonstrada, não contra-indica a utilização dos aloenxertos após a criopreservação, pois os enxertos ósseos não dependem de células vivas para ter utilidade clínica e sim da matriz óssea<sup>8</sup>.

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 quando comparado com a remoção de enxertos extra-orais<sup>48</sup>.

A incorporação do osso alógeno, na interface de união enxerto/hospedeiro, ocorre de forma mais lenta, devido à maior reação inflamatória inicial e menor revascularização<sup>28,35,42,49</sup>.

O componente celular de um aloenxerto é comumente inativado por congelamento, ou removido por um processo químico/mecânico que visa prevenir uma resposta imunológica aguda. Se um aloenxerto contendo células osteogênicas for utilizado, pode ocorrer uma resposta imunológica de rejeição ao material implantado e resultar na sua destruição<sup>8,30</sup>.

O atraso na incorporação é atribuído 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<sup>17</sup>. O osso alógeno parece agir mais como uma matriz mineral, que fornece suporte para a migração e proliferação celular<sup>30</sup>.

O componente celular de um aloenxerto é comumente inativado por congelamento, ou removido por um processo químico/mecânico que visa prevenir uma resposta imunológica aguda. Se um aloenxerto contendo células osteogênicas for utilizado, pode ocorrer uma resposta imunológica de rejeição ao material implantado e resultar na sua destruição<sup>8,30</sup>.

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<sup>50</sup>.

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<sup>7</sup>.

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<sup>30</sup>.

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 inseqüente. 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<sup>7</sup>.

As biópsias realizadas no momento da colocação dos implantes evidenciaram no exame histológico a deposição de novo osso e até mesmo ausência de resíduos do material enxertado<sup>9-11,51</sup>.

Devido aos inconvenientes da remoção do osso autógeno, como a morbidade de uma segunda área cirúrgica para a remoção do enxerto, é crescente o interesse por materiais alternativos. O osso alógeno, também denominado homógeno, obtido de um doador, surge como uma alternativa<sup>7</sup>. Com o advento dos bancos de tecidos e a ampliação e melhora das

técnicas de preservação, é maior a disponibilidade dos enxertos alógenos<sup>8</sup>, facilitando a utilização em cirurgias de reconstrução e implantodontia<sup>13</sup>.

### 2.3.1 Processamento do Aloenxerto Ósseo

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<sup>8</sup>. Portanto quanto mais agressivo o processamento menos frequente e menor é a intensidade da resposta imunológica<sup>20</sup>.

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<sup>31</sup>.

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<sup>7</sup>. Devido à perda de resistência mecânica o osso liofilizado e irradiado está indicado somente para o preenchimento de cavidades na forma triturada<sup>25</sup>.

O conteúdo colágeno do osso alógeno é mantido intacto durante o congelamento a  $-85^{\circ}\text{C}$  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. 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<sup>8</sup>.

O processamento de osso alógeno visando à segurança pode levar a associação de problemas em suas propriedades mecânicas, osteocondução e osteoindução. Osteoindução e resistência são propriedades críticas nos aloenxertos ósseos. O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é um oxidante químico com o potencial de comprometer a osteoindutividade e proteínas ósseas estruturais<sup>52</sup>.

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<sup>30</sup>.

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<sup>50</sup>.

Aloenxertos ósseos podem ser obtidos de humanos vivos e cadáveres, 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<sup>53</sup>.

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<sup>21</sup>. 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<sup>22</sup>.

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<sup>41</sup>.

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<sup>54</sup>.

A validade de estocagem do osso fresco congelado a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  é de um ano e a temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  é de cinco anos. A validade do osso liofilizado é indefinida<sup>20</sup>. Pode-se afirmar que a temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  é mais efetiva do que a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  na necrose de células ósseas. Embora num longo tempo de congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  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<sup>54</sup>.

### 2.3.1.1 Portaria do Ministério de Estado da Saúde

Portaria nº 1686/GM em 20 de setembro de 2002:

O Ministro de Estado da Saúde, no uso de suas atribuições legais, Considerando as disposições contidas no item II do Artigo 4º e nos Artigos 8º e 20 do Decreto n.º 2.268, de 30 de junho de 1997, que regulamenta a Lei nº 9.434, de 04 de fevereiro de 1997; Considerando a necessidade de incrementar a disponibilidade de tecidos musculoesqueléticos para utilização no tratamento de diversas doenças do aparelho locomotor e outras patologias; Considerando a necessidade de garantir que os tecidos musculoesqueléticos a serem utilizados em transplantes, sejam captados, avaliados, processados, estocados e disponibilizados dentro de padrões técnicos e de qualidade que a complexidade do procedimento requer; Considerando a necessidade de regulamentar, em geral, e estabelecer normas no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS para a criação, autorização de funcionamento e cadastramento de Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos, e Considerando a necessidade de dispor sobre a captação, proteção ao doador e ao receptor, coleta, processamento, estocagem, distribuição e transplante de tecidos musculoesqueléticos e de coibir que tais práticas sejam realizadas, em todo o território nacional, seja por pessoas físicas ou jurídicas, em caráter eventual ou permanente, por serviços que estejam em desacordo com o ordenamento estabelecido nesta Portaria, resolve:

[...]

Art. 3º Estabelecer para os Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos as seguintes competências/atribuições:

[...]

j - Estabelecer programas de ensino, pesquisa e desenvolvimento tecnológico nas áreas de interesse de banco de tecidos e transplante de tecidos musculoesqueléticos.<sup>55</sup>

## 2.4 ENXERTO ÓSSEO TRITURADO E EM BLOCO

As técnicas de reconstrução do processo alveolar dos maxilares foram evoluindo. Em se tratando de reconstrução dos processos alveolares dos maxilares, as técnicas de enxertia óssea empregadas são ditadas pelo tipo de defeito a ser reconstruído e, em função deste, pela forma como o material é empregado. Podemos utilizar o tecido ósseo na forma de blocos ou particulado. Em blocos, temos *onlays* para ganho em espessura ou altura, e na forma particulada, *inlays* para preenchimento de defeitos ósseos irregulares ou cavidades como os seios maxilares ou fossas nasais<sup>12</sup>.

O osso particulado e em bloco são utilizados nas reconstruções ósseas em defeitos dos maxilares, nas reabilitações com implantes dentários. O potencial osteogênico dos enxertos

ósseos autógenos é superior à de aloenxertos e xenoenxertos devido à sua capacidade para liberar fatores de crescimento osteoindutores e proporcionar uma superfície natural osteocondutora para adesão celular e crescimento<sup>56</sup>.

Os enxertos ósseos autógenos particulados podem ser compostos por osso cortical, medular ou cortico-medular, podendo ou não ser associados a materiais alógenos e aloplásticos<sup>57</sup>.

Pallesen (2002)<sup>58</sup> em seu estudo realizou defeitos ósseos bicorticais na calvaria de 15 coelhos (4 defeito em cada coelho). Dois defeitos foram preenchidos partículas pequenas (0,5 a 2mm) ou partículas grandes (10 mm) de osso autógeno. Além disso, um defeito foi deixado sem preenchimento (controle negativo). Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 3 e sacrificados após 1, 2 e 4 semanas, respectivamente. Não houve diferenças significativas na área total da superfície entre os 3 grupos. O volume total de novo osso formado em defeitos com pequenas partículas era maior e mais maduro em comparação com defeitos com grandes partículas após 2 e 4 semanas. Além disso, a reabsorção de pequenas partículas foi mais pronunciada após 4 semanas, mostrando um nível mais elevado de substituição óssea em comparação com partículas de grandes dimensões. Os estágios iniciais de regeneração óssea foram influenciados pelo tamanho das partículas de enxertos ósseos autógenos. As partículas de 0,5 a 2 mm de tamanho são mais indicadas que as partículas de 10 mm para enxerto ósseo.

Miron et al. (2011)<sup>56</sup> realizaram um estudo *in vitro*, onde partículas de osso autógeno foram coletadas por quatro técnicas comumente utilizadas, e comparadas quanto à sua capacidade para promover uma resposta osteogênica. Osteoblastos primários foram isolados e semeados em enxertos ósseos autógenos preparados a partir das mandíbulas de porcos da Índia, com um triturador ósseo, piezo-surgery<sup>3</sup>, raspador ósseo e broca de perfuração óssea. As culturas de osteoblastos foram comparadas quanto à sua capacidade para promover a ligação de células, proliferação e diferenciação. Após 4 e 8 horas, o número de células foi significativamente mais elevado com as amostras do triturador ósseo e do raspador ósseo em comparação com os que foram obtidos por broca de perfuração óssea e piezo-surgery. Padrões semelhantes foram consistentemente observados até 5 dias. Além disso, os osteoblastos semeadas nas amostras do triturador ósseo e do raspador expressaram níveis significativamente elevados de RNAm, de colágeno, osteocalcina, e osterix a 3 e 14 dias e produziu mais tecido mineralizado como avaliado por coloração com vermelho de alizarina.

---

<sup>3</sup> Mectron s.p.a. Carasco (GE) - Itália

Estes resultados sugerem que as partículas maiores de enxerto ósseo produzidas por triturador ósseo e por técnicas de raspagem óssea têm um maior potencial osteogênico do que o osso em pasta obtido com broca óssea e osso obtido pelo piezo-surgery. O osso alógeno para enxertos é utilizado pelo menos desde os anos 70 para correção de deformidades maxilofaciais<sup>17</sup>, com resultados bastante semelhantes à enxertia autógena, mas com reabsorção e incorporação mais lentas<sup>13</sup>.

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<sup>26-28,51</sup>.

A partir da década de 90, os implantes de titânio e próteses sobre implantes começaram a ser relacionados com os enxertos alógenos em bloco<sup>9-10,48,59-63</sup>.

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<sup>16</sup>. Em virtude deste planejamento, áreas onde seriam instalados implantes de pequeno diâmetro 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<sup>11,48-49,64-67</sup>.

No estudo de Keith et al. (2006)<sup>11</sup>, 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.

O aloenxerto ósseo em bloco processado por congelamento profundo associado à LLLT 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. Sendo uma alternativa para o tratamento de defeitos ósseos<sup>13</sup>.

Spin-Neto et al. (2010)<sup>67</sup> avaliaram a incorporação de enxertos ósseos em bloco, autógenos e homogêneos em humanos, através de avaliação tomográfica. Para tal, tomografias de dez pacientes (cinco tratados com enxertos ósseos homogêneos e cinco com enxertos ósseos autógenos), obtidas previamente a cirurgia de enxerto, aos 14 e aos 180 dias pós-operatórios, foram avaliadas em relação à espessura, altura e densidade ósseas. Através de análises

estatísticas, os resultados demonstraram similaridade entre a espessura e a densidade óssea obtida nos grupos tratados com enxerto ósseo autógeno e homogêneo. Concluíram que o enxerto de osso homólogo apresentou, sob um ponto de vista tomográfico e 180 dias de seguimento, características semelhantes ao enxerto ósseo autógeno, tendo proporcionado e mantido um aumento de espessura capaz de permitir a reabilitação com implantes osseointegráveis.

## 2.5 LASERTERAPIA

### 2.5.1 Aplicações Clínicas

Lievens (1991)<sup>68</sup> destaca a aplicação do laser terapêutico na cirurgia, afirmando que as áreas irradiadas no pós-operatório mostraram uma regeneração mais rápida dos vasos linfáticos, maior aporte microcirculatório e, conseqüentemente, menor edema por facilitar o equilíbrio das pressões hidrostáticas de filtração e absorção.

Gutknecht e Eduardo (2003)<sup>69</sup>, indicam que o laser terapêutico de baixa intensidade promove uma coagulação mais rápida, menor desconforto pós-operatório e cicatrização mais rápida no tratamento de cáries dentárias, menor dor e tempo para formação da dentina. O laser terapêutico tende a promover quando em gengivites, dor pouco intensa, menor sangramento e cicatrização mais rápida.

A laserterapia auxilia o profissional a proporcionar ao paciente um pós-operatório mais confortável, com menor edema e equimose além de baixo índice de manifestação dolorosa, pois possui ação terapêutica aumentando a microcirculação e menor tempo para reparar o tecido<sup>70</sup>.

### 2.5.2 Efeitos da Laserterapia na Osteogênese

A célula tem um limiar de sobrevivência, segundo o tecido onde está localizada e seu estado fisiológico. Quando se trabalha respeitando este limiar oferecendo uma baixa potência de energia, estimulamos a membrana celular e suas mitocôndrias. Dessa forma, o laser, estará induzindo a célula à biomodulação, ou seja, trabalhará buscando um estado de normalização da região afetada, denominado laserterapia<sup>71</sup>.

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<sup>72</sup>.

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<sup>73</sup>.

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<sup>74</sup>.

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 de colágeno, formação de enzimas específicas, auxílio ao sistema linfático, benefícios no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (microcirculação), aumento significativo na síntese de proteínas e DNA<sup>37,70</sup>.

Karu (1987)<sup>75</sup> e Karu et al. (2001)<sup>76</sup> 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<sup>77</sup>.

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<sup>37</sup>. 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<sup>37,78</sup>.

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 regeneração óssea<sup>79</sup>.

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<sup>80</sup>. 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<sup>38,80</sup>.

A laserterapia é uma modalidade de tratamento clínico que resulta em efeitos não termiais 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<sup>81</sup>.

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<sup>82</sup>. A laserfotobiomodulação é pouco detectável a partir de 30 dias após o tratamento, devido ao fato que durante os estágios iniciais de cicatrização 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 de cicatrização 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<sup>37,83</sup>.

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

( $\lambda$ ). É importante ser lembrado 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 a 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<sup>1,37,83</sup>.

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<sup>81,84</sup>.

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<sup>81</sup>.

Obradovic, Kesic e Pesevska (2009)<sup>85</sup> 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 cirurgiões dentistas para auxiliar e melhorar a qualidade óssea quando fatores predictivos negativos de incorporação e osseointegração são identificados.

### **2.5.3 Estudos Sobre Laserterapia na Regeneração Óssea**

O objetivo do estudo de Dörtbudak, Haas e Mallath-Pokorny (2000)<sup>84</sup> 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  $4,8 \text{ J/cm}^2$ . 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 et al. (2002)<sup>73</sup> foi avaliar morfometricamente a quantidade de novo osso formado pela irradiação com laser de AsGaAl ( $\lambda$  830 nm) em feridas cirúrgicas criadas no fêmur de ratos com aproximadamente  $1 \text{ cm}^2$ . Foram utilizados neste estudo 40 ratos *Wistar* que foram divididos em quatro grupos com 10 animais em cada: grupo A (12 sessões,  $4,8 \text{ J/cm}^2$  por sessão, dose total  $57,6 \text{ J/cm}^2$ , tempo de observação de 28 dias); grupo C (três sessões,  $4,8 \text{ J/cm}^2$  por sessão, dose total de  $14,4 \text{ J/cm}^2$ , 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 de cicatrização.

Dörtbudak, Haas e Mallath-Pokorny (2002)<sup>86</sup> conduziram um estudo para avaliar os efeitos da irradiação de baixa energia a laser sobre os osteócitos e reabsorção óssea no sítio do implante. Demonstraram 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, grau de reabsorção óssea, em contraste, não foi afetado pela irradiação a laser.

Nicola et al. (2003)<sup>87</sup> 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 foram irradiados e 24 serviram de controle. O grupo irradiado foi tratado com laser de AsGaAl de  $\lambda$  660 nm,  $10 \text{ J/cm}^2$  de radiação por sessão no 2º, 4º, 6º, 8º dias após a cirurgia, com um total de  $40 \text{ J/cm}^2$  de energia. Os animais foram sacrificados 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 erodida 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)<sup>88</sup> teve como objetivo avaliar histologicamente o efeito da laserterapia de baixa potência (LLLT) ( $\lambda$  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®. 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/cm<sup>2</sup> era aplicada ( $\varnothing$ ~0.6 mm, 40 mW) e a dose total por sessão era de 16 J/cm<sup>2</sup>. A dose total foi de 128 J/cm<sup>2</sup>. Os animais foram sacrificados 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;  $\lambda$  632,8 nm) e do osso orgânico bovino Bio-Oss® 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 sacrificados. 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.

No estudo de Khadra et al. (2004)<sup>74</sup> o objetivo foi investigar o efeito da laserterapia de baixa potência com laser de diodo de AsGaAl ( $\lambda$  830 nm) na cicatrização de implantes de titânio. O tempo de cicatrização foi de oito semanas. Dois discos de implante com diâmetro de 6,25 mm e altura de 1,95 mm foram implantados na cortical óssea de cada tíbia proximal de 12 coelhos (n=48). A laserterapia de baixa potência foi usada imediatamente após a cirurgia e a cada dois dias por 10 dias. Os animais foram sacrificados 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 a 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 (AsGaAl;  $\lambda$  830 nm) no processo de reparo de defeitos ósseos criados em ratos submetidos a implante de osso bovino liofilizado (matriz orgânica) (Gen-ox®), associadas ou não à membrana biológica de osso bovino liofilizado desmineralizado (Gen-derm®), foi avaliado histologicamente por Gerbi et al. (2005)<sup>85</sup>. 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/cm<sup>2</sup> por sessão dividido em quatro pontos em volta de cada defeito (4 J/cm<sup>2</sup>) iniciando a primeira irradiação imediatamente após a cirurgia e repetida 7 vezes a cada 48 horas, perfazendo um total de 128 J/cm<sup>2</sup>. Os animais foram sacrificados com 15, 21 e 30 dias. 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 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.

O efeito da irradiação com laser de baixa potência (AsGaAl –  $\lambda$  670 nm) no reparo ósseo de fêmures de ratos foi investigado por Merli et al. (2005)<sup>83</sup>. Foram utilizados 10 ratos, sendo realizadas 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/cm<sup>2</sup> no transoperatório (antes da sutura) e após a sutura foram irradiados mais 6 J/cm<sup>2</sup> 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/cm<sup>2</sup>) nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. A dose total foi de 27 J/cm<sup>2</sup>. Os ratos foram sacrificados 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 irradiados.

Lopes et al. (2005 e 2007)<sup>90,91</sup> em dois estudos onde foram colocados implantes na tíbia de coelhos, observaram resultados semelhantes com uma maior concentração de hidroxiapatita de cálcio nos grupos em que foi realizada a fotobiomodulação ( $\lambda$  830 nm sete sessões de laser com 48 h de intervalos, 21.5 J/cm<sup>2</sup> por sessão, 10 mW e 86 J/cm<sup>2</sup> de dose total de tratamento na pesquisa publicada em 2005. E  $\lambda$  830 nm sete sessões de laser com 48 h de intervalos, 86 J/cm<sup>2</sup> por sessão, 10 mW e dose total de 602 J/cm<sup>2</sup> na pesquisa publicada em 2007). A análise foi realizada através níveis moleculares com Raman Espectroscopia. Após 15 dias da cirurgia, não houve diferenças significativas entre os grupos controle e irradiados em relação à concentração de hidroxiapatita de cálcio. Isto pode ser o resultado, do fato que, durante os estágios precoces da reparação, a atividade osteoblástica é determinada pela proliferação e a deposição de hidroxiapatita de cálcio inicia mais tarde, o que resulta na formação de osso imaturo, ainda pobre em hidroxiapatita de cálcio. Nos grupos com 30 dias eram significativamente maiores as concentrações de hidroxiapatita de cálcio nos grupos irradiados. Isto representa o aumento na habilidade de mais osteoblastos maduros para secretar hidroxiapatita de cálcio nos grupos irradiados, enquanto que nos grupos controle a proliferação celular ainda está ocorrendo. A deposição de hidroxiapatita de cálcio representa a maturação óssea. Os resultados destes estudos indicam que a laserterapia de baixa potência aumenta a concentração de hidroxiapatita de cálcio no osso, e é indicativo de maior resistência óssea e as diferenças observadas entre os grupos irradiados e controles são provavelmente devido à escolha de um comprimento de onda de maior penetração ( $\lambda$  830 nm) e a habilidade para aumentar a atividade em nível celular, com um aumento da síntese de

ATP, diferenciação osteoblástica precoce e a liberação de fatores de crescimento. Os autores concluíram que a fotobiomodulação com laser infravermelho aumenta a reparação óssea.

A influência da radiação laser AsGaAl ( $\lambda$  830 nm) no processo de cicatrização de enxertos ósseos autógenos em ratos foi avaliado histologicamente por Weber et al. (2006)<sup>4</sup>. 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  $10 \text{ J/cm}^2$  (fracionada em quatro pontos de  $2,5 \text{ J/cm}^2$  cada) e foi aplicado no leito cirúrgico (G2 e G4) e no enxerto ósseo (G3 e G4). A irradiação a laser foi aplicada no transoperatório no leito cirúrgico e nos enxertos. Após foram aplicadas a mesma dose a cada 48 horas durante 15 dias. Portanto os grupos G2 e G3 receberam uma dose total de  $80 \text{ J/cm}^2$  e o grupo G4 recebeu  $90 \text{ J/cm}^2$ . Os animais foram sacrificados 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<sup>92</sup> confeccionaram defeitos ósseos de 2,5 mm em fêmures de 27 ratos, sendo que 14 foram submetidos à radiação com laser diodo infravermelho (AsGaAl;  $\lambda$  830 nm), e 13 serviram como controle sem irradiação. Os animais foram sacrificados com 7, 15 e 21 dias e as doses totais de radiação foram respectivamente de 24, 48 e  $66 \text{ J/cm}^2$ . 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 periostal 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 (AsGaAl;  $\lambda$  830nm), aplicado no período de ativação e consolidação de mandíbulas submetidas a distração osteogênica 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  $4,0 \text{ J/cm}^2$  em quatro pontos pré-determinados, somando  $16 \text{ J/cm}^2$  por sessão, com uma dose total de  $80 \text{ J/cm}^2$ . 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 sacrificados 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<sup>93</sup>.

Foi realizado um estudo experimental por Jakse et al. (2007)<sup>79</sup> 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 sacrificados. 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 ( $\lambda$  680 nm, 75 mW). A média de densidade de energia por irradiação foi de  $3\text{-}4 \text{ J/cm}^2$ . 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 ( $\lambda$  790 nm) no reparo de enxertos ósseos Torres et al. (2008)<sup>94</sup> 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 morfogénéticas (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<sup>2</sup> por sessão dividida em quatro pontos em volta do defeito (2,5 J/cm<sup>2</sup> 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<sup>2</sup> (G II) e 90 J/cm<sup>2</sup> (G IV). Os animais foram sacrificados após 40 dias. Foi realizado análise histológica e microscópica semi-quantitativa. 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)<sup>83</sup> 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. Quarenta e cinco ratos foram divididos em quatro grupos: grupo I (controle); grupo II (laser de fotobiomodulação  $\lambda$  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/cm<sup>2</sup>. Os animais foram sacrificados 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)<sup>95</sup> investigaram a influência do laser de baixa potência de  $\lambda$  830 nm de arseneto de gálio-alumínio (AsGaAl) (ondas contínuas de 40 mW e  $4 \text{ J/cm}^2$ , com densidade total de energia de  $16 \text{ J/cm}^2$ ) 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 observados 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)<sup>96</sup> realizaram um estudo com o objetivo de observar a influência do laser infravermelho de baixa potência ( $\lambda$  830 nm) no valor do torque de remoção de implantes sem estabilidade inicial instalados em tíbia 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 tíbia de cada coelho. Eles foram distribuídos de forma aleatória em dois grandes grupos, não irradiados e irradiados com laser (sete aplicações de  $86 \text{ J/cm}^2$  cada sessão, com uma dose total de  $602 \text{ J/cm}^2$ ), os quais se subdividiam em três grupos, de acordo com o dia em que foram sacrificados – 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 cicatrização óssea.

Valiati (2011)<sup>13</sup> em seu estudo analisaram aloenxertos e autoenxertos em bloco na calvária de 12 coelhos brancos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus Cuniculos*) divididos em quatro grupos: dois grupos com laserterapia de baixa potência (aloenxerto e autoenxerto) e outros dois 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 830nm - de 4 J/cm<sup>2</sup> em quatro pontos da calota craniana perfazendo um total de 16 J/cm<sup>2</sup> por aplicação. A dose total do tratamento após as oito aplicações foi de 128 J/cm<sup>2</sup>. Neste estudo houve um aumento da deposição de fibras colágenas, da remodelação óssea e um menor infiltrado inflamatório nos grupos irradiados nos aloenxertos aos 35 dias quando comparado ao grupo controle alógeno. Ocorreu um efeito positivo qualitativo da laserterapia de baixa potência, acelerando o processo de osteogênese, incorporação e remodelação de aloenxertos e autoenxertos ósseos em bloco.



*Metodologia*

---

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto desta pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) sob protocolo de nº 1.13.08 (ANEXO A); pelo Departamento, Comissão de Pesquisa, Conselho de Centro e Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) (ANEXO B); pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) sob o nº 0032/09 (ANEXO C) e pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS sob o registro CEUA 09/00137 (ANEXO D).

Neste trabalho foram observadas as Normas para o Uso Científico de Animais, conforme a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008<sup>97</sup>, respeitando-se também os Princípios Éticos na Pesquisa Experimental, determinados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

#### 3.2 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 de Laser em Odontologia.

#### 3.3 MODELO ANIMAL E ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

O presente estudo foi desenvolvido com 24 coelhos brancos da raça Nova Zelândia, espécie *Oryctolagus cuniculus*, da ordem Lagomorpha, gênero *Oryctolagus*, machos, adultos jovens, com aproximadamente 10 meses de idade, com peso médio entre 4,0Kg a 5,0Kg cada.

Durante o planejamento e a elaboração do projeto de pesquisa, uma das principais dúvidas é saber o valor do n (tamanho da amostra) necessário para o estudo. Apesar desta pergunta ser muito freqüente, as dificuldades em se obter um cálculo amostral adequado são muitas e raramente encontra-se uma resposta precisa.

É preciso fornecer informações que dependam de estudos anteriores, dados de literatura e do conhecimento sobre o fenômeno que será estudado. Um bom pesquisador deve saber que um cálculo de amostra não depende apenas de “parâmetros estatísticos”, tais como o nível de significância  $\alpha$  e o poder do teste. Mais importantes do que estes parâmetros são as informações que devem ser fornecidas com base no conhecimento clínico, como por exemplo, estimativas sobre a variabilidade da medida de interesse e a diferença considerada clinicamente relevante que se deseja detectar (muitas vezes chamada de “tamanho do efeito”).

Convém refletir sobre a real necessidade de um cálculo que utiliza apenas teoria estatística sem levar em conta outras questões importantes, tais como dificuldades logísticas na obtenção dos dados. Nem sempre o cálculo baseado em alfas, betas, etc. é possível ou imprescindível.

O tamanho da amostra deve ser justificado com base em outros estudos, pois o cálculo por meio de fórmulas exige informações referentes à variabilidade da variável de interesse e sobre qual a diferença entre os parâmetros com relevância clínica.

Quando se utiliza testes não paramétricos, há uma dificuldade na determinação do tamanho das amostras, pois os mesmos são aplicados para distribuições livres (não normais), podendo ter alta variabilidade e amostras pequenas.

Portanto, para determinação do tamanho da amostra deste estudo com modelo experimental coelho, optou-se por assumir o número em 10 para cada grupo e 4 para o grupo doador alógeno, baseando-se nos estudos de Reis et al. (2008)<sup>98</sup> e Rocha et al. (2009)<sup>99</sup>, nos quais o “n” de cada grupo, seja teste ou controle, ficou estabelecido entre 08 e 15. Estas pesquisas foram realizadas para estudar a cicatrização de feridas com a associação da laserterapia de baixa potência e todas elas apresentaram resultados estatisticamente significativos.

A manutenção dos animais foi feita sob condições satisfatórias, com temperatura, umidade e iluminação adequadas, no Setor de Cunicultura da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) seguindo a rotina do mesmo. Os animais permaneceram em gaiolas individuais apropriadas ao tamanho de cada animal e suspensas, que evita o contato direto com urina e fezes. A dieta foi instituída com ração específica para a espécie e água *ad libitum*.

### **3.3.1 Coelhos Doadores dos Enxertos Ósseos**

Foram utilizados quatro coelhos como doares do tecido ósseo em que foram retirados seis blocos ósseos da calvária de cada coelho com 8mm de diâmetro cada bloco, totalizando

vinte e quatro blocos ósseos os quais foram triturados e distribuídos proporcionalmente em vinte frascos que após o congelamento profundo serviram como aloenxertos ósseos triturados.

Os enxertos ósseos triturados 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<sup>100</sup>.

### 3.3.2 Coelhos Receptores dos Enxertos Ósseos Triturados

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

Foram formados os seguintes grupos nos modelos experimentais com aloenxertos triturados implantados no defeito crítico de 8mm de diâmetro do lado direito da calota craniana de cada animal: cinco animais tratados com aloenxerto ósseo triturado e laserterapia com 35 dias de cicatrização; cinco animais tratados com aloenxerto ósseo triturado e sem laserterapia com 35 dias de cicatrização (controle); cinco animais tratados com aloenxerto ósseo triturado e laserterapia com 70 dias de cicatrização; cinco animais tratados com aloenxerto ósseo triturado e sem laserterapia com 70 dias de cicatrização (controle).

Além destes grupos, foram formados grupos de controle negativo (com o coágulo sanguíneo) na região anterior da sutura sagital e centro frontal da calvária e grupos de controle positivo (com osso autógeno triturado) no lado esquerdo da calvária dos mesmos animais dos aloenxertos e da mesma forma: cinco animais tratados com autoenxerto ósseo triturado e laserterapia com 35 dias de cicatrização; cinco animais tratados com autoenxerto ósseo triturado e sem laserterapia com 35 dias de cicatrização; cinco animais tratados com autoenxerto ósseo triturado e laserterapia com 70 dias de cicatrização; cinco animais tratados com autoenxerto ósseo triturado e sem laserterapia com 70 dias de cicatrização. O osso autógeno foi o osso proveniente dos defeitos e foi triturado no trans-cirúrgico com triturador ósseo<sup>4</sup>. O grupo do controle negativo (coágulo sanguíneo) foi dividido da seguinte maneira: cinco animais tratados com laserterapia com 35 dias de cicatrização do defeito ósseo; cinco

---

<sup>4</sup> Triturador ósseo desenvolvido pelo projeto de pesquisa intitulado: “Projeto de Particulação óssea para enxerto dentário” com número de contrato 12388/2008-9 financiado pela FAPESC (Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do estado de Santa Catarina).

animais tratados sem laserterapia com 35 dias de cicatrização do defeito ósseo; cinco animais tratados com laserterapia com 70 dias de cicatrização do defeito ósseo; cinco animais tratados sem laserterapia com 70 dias de cicatrização do defeito ósseo (Tabela 1).

Tabela 1: Organização dos Grupos Experimentais

<b>Grupos</b>	<b>Tipo de Tratamento</b>	<b>Tipo de Enxerto</b>	<b>Número de Dias de Incorporação</b>	<b>Número de Animais</b>
<b>Controle Alógeno 35dias</b>	—	Aloenxerto triturado	35 dias	5 coelhos
<b>Controle Autógeno 35dias</b>	—	Autoenxerto triturado	35 dias	5 coelhos (mesmo coelho grupo Controle Alógeno 35dias)
<b>Coágulo Controle 35dias</b>	—	Coágulo sanguíneo	35 dias	5 coelhos (mesmo coelho do grupo Controle Alógeno 35dias)
<b>Laser Alógeno 35dias</b>	Laserterapia	Aloenxerto triturado	35 dias	5 coelhos
<b>Laser Autógeno 35dias</b>	Laserterapia	Autoenxerto triturado	35 dias	5 coelhos (mesmo coelho grupo Laser Alógeno 35dias)
<b>Coágulo Laser 35dias</b>	Laserterapia	Coágulo sanguíneo	35 dias	5 coelhos (mesmo coelho do grupo Laser Alógeno 35dias)
<b>Controle Alógeno 70dias</b>	—	Aloenxerto triturado	70 dias	5 coelhos
<b>Controle Autógeno 70dias</b>	—	Autoenxerto triturado	70 dias	5 coelhos (mesmo coelho grupo Controle Alógeno 70dias)
<b>Coágulo Controle 70dias</b>	—	Coágulo sanguíneo	70 dias	5 coelhos (mesmo coelho do grupo Controle Alógeno 70dias)
<b>Laser Alógeno 70dias</b>	Laserterapia	Aloenxerto triturado	70 dias	5 coelhos
<b>Laser Autógeno 70dias</b>	Laserterapia	Autoenxerto triturado	70 dias	5 coelhos (mesmo coelho grupo Laser Alógeno 70dias)
<b>Coágulo Laser 70dias</b>	Laserterapia	Coágulo sanguíneo	70 dias	5 coelhos (mesmo coelho do grupo Laser Alógeno 70dias)

Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

### 3.4 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 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 do 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<sup>®5</sup>) na dose de 20mg/Kg e Xilazina (Anasedan<sup>®6</sup>), 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 24G para administração de soro fisiológico 0,9% a 6 gotas/minuto. A manutenção da anestesia foi realizada através de uma máscara acoplada a um sistema sem reinalação de gases com administração de Isoflurano (Isoforine<sup>®7</sup>) 1 a 1,5 CAM (concentração alveolar mínima) diluído em oxigênio a 100%, com fluxo de 2L/min, através de um vaporizador universal (Oxygel<sup>®8</sup>). Foi realizada também a anestesia infiltrativa com 0,5ml de lidocaína (2%) (Xylestin<sup>®9</sup>) sem vasoconstritor na região frontoparietal.

A antisepsia da pele foi realizada com polivinilpirrolidona-iodo a 1% (Povidine<sup>®10</sup>) e os campos cirúrgicos estéreis isolaram a área operatória.

A incisão foi realizada com espessura total até o perióstio com lâmina nº15 com aproximadamente 5cm sobre a sutura sagital e centro do frontal (Figura 1) e após foi realizada a dissecação dos tecidos moles com descolador freer (Golgran<sup>®11</sup>) (Figura 2).

---

<sup>5</sup> Virbac Saude Animal, São Paulo, SP-Brasil

<sup>6</sup> Vetbrands Saude Animal, Paulínia, SP-Brasil

<sup>7</sup> Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP-Brasil

<sup>8</sup> Oxygel<sup>®</sup>, São Paulo, SP-Brasil

<sup>9</sup> Cristália Produtos químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP-Brasil

<sup>10</sup> Johnson & Johnson do Brasil Ind. e Com. Prod. para a Saúde Ltda, São Paulo, SP-Brasil

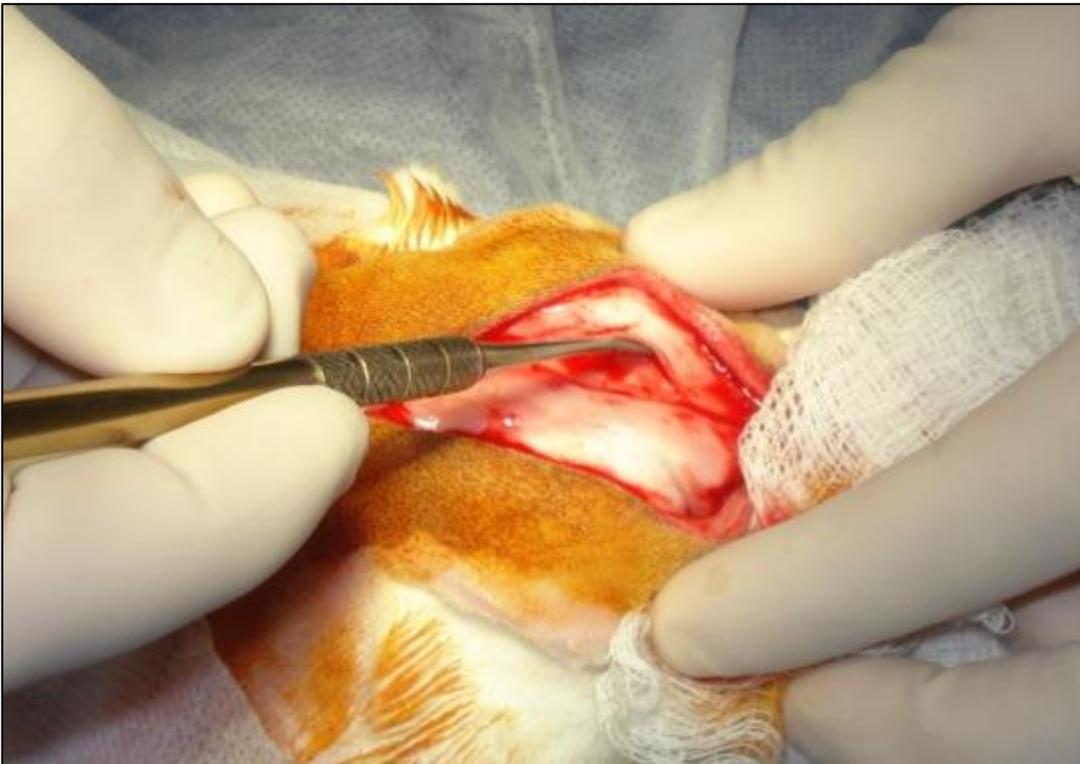
<sup>11</sup> Golgran, São Paulo, SP-Brasil

Figura 1: Incisão Sobre a Sutura Sagital e Centro do Frontal



Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Figura 2: Dissecção dos Tecidos Moles com Descolador Freer



Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Nos coelhos doadores a ostectomia para a retirada dos blocos da calota craniana foi realizada com um motor cirúrgico (Kavo<sup>®12</sup>) e peça-de-mão reta (Kavo<sup>®</sup>) com rotação de 800rpm e com uma broca trefina de 8 mm (Neodent<sup>®13</sup>) sob irrigação abundante com soro fisiológico (Figura 3).

Figura 3: Ostectomia para a Retirada dos Blocos da Calota Craniana



Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

O bloco de enxerto ósseo foi cuidadosamente elevado com um descolador freer (Golgran<sup>®</sup>) mantendo a integridade da dura-máter e do cérebro (Figura 4).

---

<sup>12</sup> Fábrica Kavo do Brasil Ind. Com. Ltda, Joinville, SC-Brasil

<sup>13</sup> Neodent, JJGC Indústria e Comércio de Materiais Dentários S/A, Curitiba, PR-Brasil

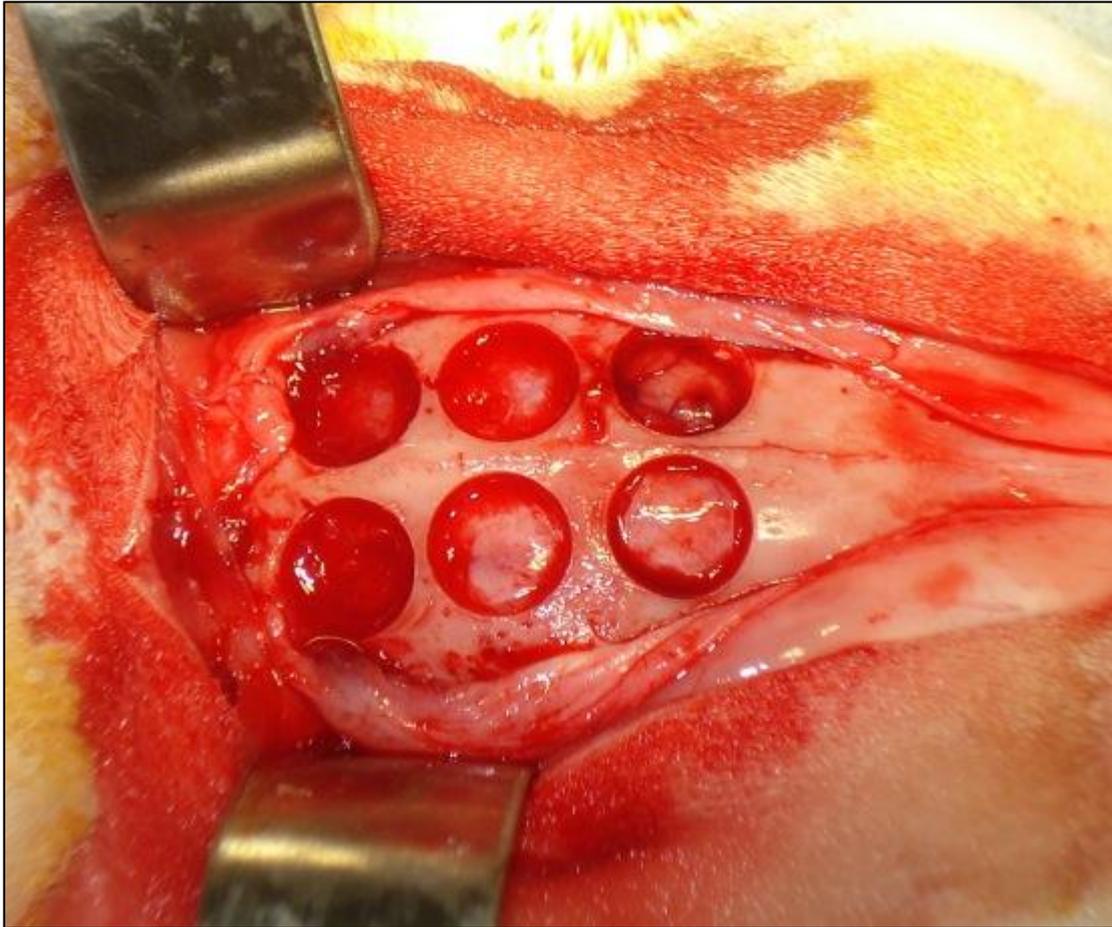
Figura 4: Enxerto Ósseo Sendo Retirado Mantendo a Integridade da Dura-Máter e do Cérebro



Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Foram retirados seis blocos ósseos da calota craniana de cada coelho doador (Figura 5), totalizando 24 blocos para aloenxertos ósseos, os quais foram triturados.

Figura 5: Calota Craniana de Coelho Doador, após a Retirada dos Seis Blocos Ósseos



Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Os blocos ósseos alógenos retirados foram lavados copiosamente com soro fisiológico 0,9% e removidos todos os tecidos moles aderidos, realizou-se a trituração dos ossos com triturador ósseo<sup>14</sup> o tamanho das partículas ósseas geradas pelo triturador são macropartículas que variam de 1 a 2 mm de tamanho (Figura 6), as partículas ósseas foram então acondicionadas em embalagens estéreis e congelados a -70 graus centígrados em freezer apropriado e mantidos em congelamento profundo por 30 dias antes das cirurgias de enxerto.

---

<sup>14</sup> Triturador ósseo desenvolvido pelo projeto de pesquisa intitulado: “Projeto de Particulação óssea para enxerto dentário” com número de contrato 12388/2008-9 financiado pela FAPESC (Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do estado de Santa Catarina).

Figura 6: a) Triturador Ósseo e Cuba com S.F 0,9% com Blocos Ósseos Submersos; b) Lâmina do Triturador Ósseo e Osso Triturado



Fonte: FAPESC 12388/2008-9<sup>15</sup>

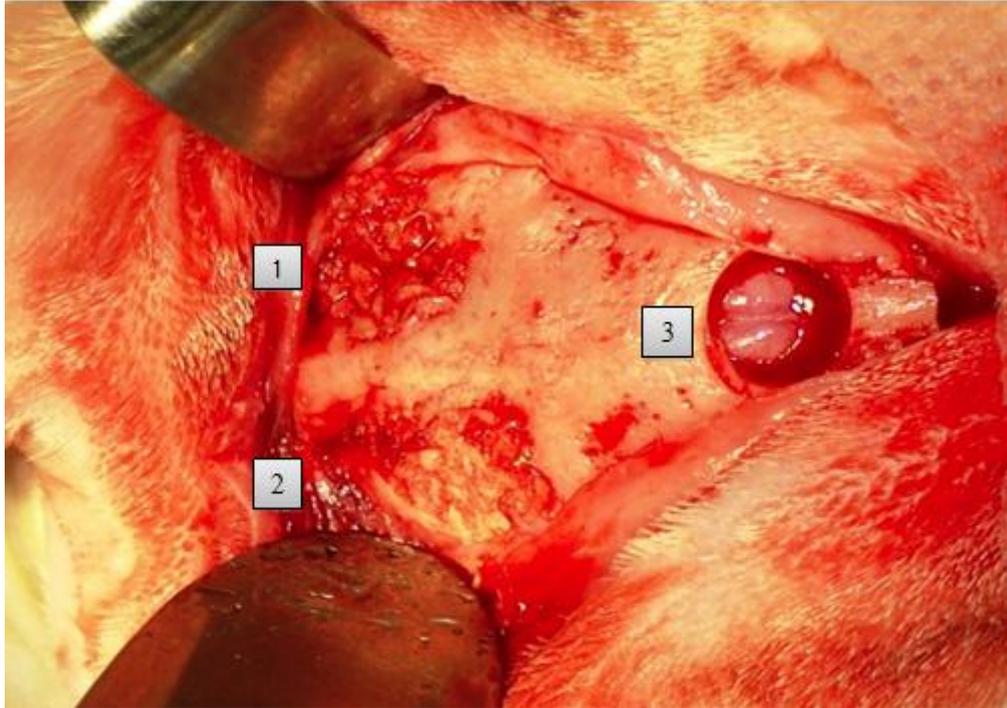
A morte dos quatro coelhos doadores alógenos foi subsequente ao procedimento, o protocolo de morte constituiu associação de cetamina 50 mg/kg associado a 1mg/Kg de diazepam seguido de 600mg de cloreto de potássio por via intravenosa na veia marginal da orelha.

Após 30 dias de congelamento dos ossos alógenos triturados, os coelhos receptores foram anestesiados da mesma forma e os procedimentos de incisão e descolamento do retalho foram os mesmos.

Os enxertos alógenos triturados foram retirados das embalagens estéreis e descongelados com soro em temperatura ambiente. Da região mais anterior da calota foi retirado com a broca trefina de 8 mm um enxerto em bloco autógeno o qual foi triturado para servir como controle positivo da incorporação óssea, e este foi adaptado no lado esquerdo da mesma forma o osso triturado alógeno foi adaptado com descolador de freer compactando ao máximo o enxerto no defeito do lado direito da calota para obter uma melhor estabilidade (Figura 7).

<sup>15</sup> Triturador ósseo desenvolvido pelo projeto de pesquisa intitulado: “Projeto de Particulação óssea para enxerto dentário” com número de contrato 12388/2008-9 financiado pela FAPESC (Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do estado de Santa Catarina).

Figura 7: 1) Enxerto Triturado Autógeno; 2) Alógeno e 3) Controle Negativo



Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

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®<sup>16</sup>, de modo contínuo.

Foi instituído antibioticoterapia com enfloraxacina por via intramuscular na dose de 5mg/Kg a cada 24h. A analgesia pós-operatória foi instituída com meloxicam 0,1mg/kg a cada 24h. Em casos em que os animais manifestassem dor intensa uma dose de resgate com tramadol 2mg/Kg<sup>17</sup> foi administrado.

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

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.

<sup>16</sup> Johnson & Johnson do Brasil Ind. e Com. Prod. para a Saúde Ltda, São Paulo, SP-Brasil

<sup>17</sup> Tramadol® 50mg/ml, Cristália Produtos químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP

### 3.5 PROTOCOLO LASERTERAPIA NÃO ABLATIVA

Imediatamente, ao término da cirurgia os grupos L (laser) receberam a irradiação com laser infravermelho, 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 (AsGaAl) – comprimento de onda de 830nm - de 4 J/cm<sup>2</sup> na potência de 100 mW, em modo contínuo (Thera Lase<sup>®18</sup>) em 4 pontos com a ponteira num ângulo de 90° a 0,5 cm anterior, posterior, lateral esquerda e lateral direita das áreas enxertadas, perfazendo um total de 16 J/cm<sup>2</sup> por aplicação. A dose total do tratamento após as oito aplicações foi de 128 J/cm<sup>2</sup>.

### 3.6 MORTE DOS ANIMAIS E REMOÇÃO DAS AMOSTRAS

A morte dos animais foi realizada com cinco animais de cada grupo (laser e controle) no período de 35 dias (cinco semanas) e cinco animais de cada grupo (laser e controle) no período de 70 dias (10 semanas) após a realização dos enxertos. O protocolo de morte foi a associação de Tiletamina + zolazepam 20mg/kg e Xilazina 3mg/kg por via Intramuscular, seguido de 300mg de cloreto de potássio<sup>19</sup> por via intravenosa na veia marginal da orelha.

Após a morte dos animais, foram realizadas a dissecação e ostectomia com broca trefina da Neodent<sup>®20</sup> de 10 mm de diâmetro, englobando os enxertos e a região do coágulo (controle negativo) com margem de tecido ósseo da área receptora.

### 3.7 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS E DE ANÁLISE

Os espécimes 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

---

<sup>18</sup> DMC Equipamentos Ltda., São Carlos, SP, Brasil

<sup>19</sup> Cloreto de Potássio 10%. Cristália Produtos químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP

<sup>20</sup> Neodent, JJGC Indústria e Comércio de Materiais Dentários S/A, Curitiba, PR-Brasil

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 com micrótomo foram no sentido longitudinal com espessura de 5 µm. As lâminas histológicas foram coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H&E).

A outra metade da amostra foi processada por 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 avaliadas a vácuo em microscópio eletrônico de varredura.

### 3.8 ANÁLISE DOS ENXERTOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) utilizado<sup>21</sup> tem resolução até 3,5 nm (no modo elétron secundário). Para este trabalho foram utilizados faixa de aumentos de aproximadamente 25X, 45X, 250X, 500X e 1.000X e tensão de aceleração de 200V a 30kV. O MEV utilizado, permite dois modos para a formação da imagem, SE (Elétrons secundários) e BSE (Elétrons Retroespalhados). No modo SE a imagem é formada a partir do perfil da amostra e no modo BSE a imagem é formada pela diferença do número atômico dos materiais da amostra, sendo tons de cinza mais escuros relacionados a números atômicos menores e tons de cinza mais claros a números atômicos mais altos.

A análise descritiva morfológica foi através das imagens obtidas na interface entre o enxerto e o leito receptor, num corte longitudinal, no centro das paredes laterais entre a área receptora e a área enxertada, de cada uma das amostras com aumentos descritos anteriormente.

### 3.9 ANÁLISE DOS ENXERTOS POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Para a avaliação dos efeitos da laserterapia nos tecidos ósseos utilizou-se a Microscopia Óptica (MO). Imagens foram obtidas com aumento de 40X e 100X. O microscópio óptico utilizado foi Olympus<sup>®22</sup> CX31RTSF, e a câmera utilizada para as fotos

---

<sup>21</sup> Philips® modelo XL30

<sup>22</sup> Olympus Corporation, Philippines

de microscopia óptica da marca Olympus® modelo DP 2 TWAIN e o programa de imagens DP2-BSN Olympus Soft Imaging Solutions®<sup>23</sup>.

A análise foi por histologia descritiva e semi-quantitativa adaptado das pesquisas de Weber et al. (2006)<sup>4</sup>, Torres et al. (2008)<sup>94</sup> e Pinheiro et al. (2009)<sup>83</sup> descritas anteriormente.

Tabela 2: Critérios Quali-Quantitativos Utilizados para Análise de Microscopia Óptica

	Deposição fibras colágenas	Remodelação óssea	Neoformação óssea com mineralização	Preenchimento lacunas osteocíticas	Incorporação do enxerto	Infiltrado inflamatório	Vascularização
Não	0	0	0	0	0	0	0
Leve	1	1	1	1	1	1	1
Moderado	2	2	2	2	2	2	2
Acentuado	3	3	3	3	3	3	3

Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

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 que realizou análise em MO e em MEV).

Nos quesitos analisados, **deposição de fibras colágenas, remodelação óssea** (processo fisiológico de reabsorção óssea pelos osteoclastos e deposição de novo osso pelos osteoblastos), **preenchimento das lacunas osteocíticas, incorporação do enxerto na interface, infiltrado inflamatório e vascularização** os critérios semi-quantitativos utilizados foram: **Não** – sem presença, **Leve** – presença de menos de 25%, **Moderado** – presença de 25% a 50% e **Acentuado** – presença de mais de 50%.

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 (Prof. Dr. Aldo Gava<sup>24</sup>) com calibração prévia e cada escore foi aferido 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.

<sup>23</sup> Olympus Corporation, Münster, Germany

<sup>24</sup> Professor Titular da Disciplina de Patologia Animal do Curso de Medicina Veterinária da UDESC.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENXERTOS

A análise estatística foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney para fazer a comparação dos resultados entre o grupo controle e o experimental para uma das variáveis de interesse. Adotou-se um nível de significância de 5% e utilizou-se o software SPSS®<sup>25</sup> versão 17. As variáveis, deposição de fibras colágenas, remodelação óssea, preenchimento de lacunas osteocíticas, incorporação do enxerto, infiltrado inflamatório e vascularização foram operacionalizadas por meio de uma escala intervalar, variando de 0 a 3. Assim, o valor 0 (zero) significa Não – sem presença; o valor 1 (um) significa Leve – presença de menos de 25%; o valor 2 (dois) significa Moderado – presença de 25% a 50%; e o valor 3 (três) significa Acentuado – presença de mais de 50%.

---

<sup>25</sup> SPSS for Windows, versão 17, Microsoft Corporation®, EUA.



*Resultados*

---

## 4 RESULTADOS

Durante os experimentos, não houve complicações ou intercorrências no pós-operatório e no período de cicatrização. 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.

### 4.1 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DESCRITIVA E QUANTITATIVA POR MICROSCOPIA ÓPTICA

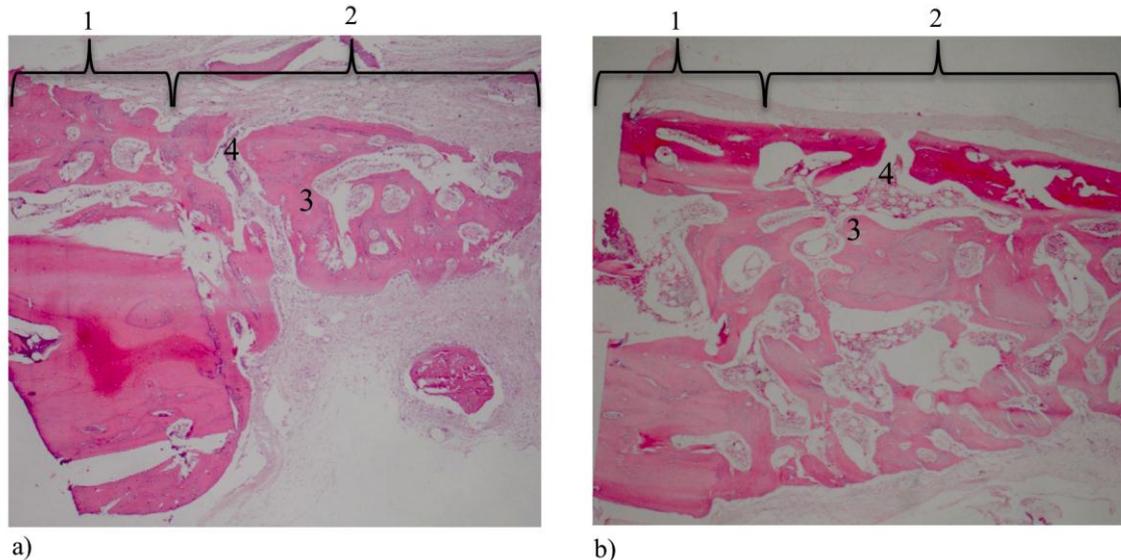
A avaliação histológica revelou alterações significativas, principalmente com relação ao preenchimento das lacunas ósseas, desaparecimento do tecido mielóide do osso enxertado com substituição por tecido fibrocolagenoso, reação inflamatória composta por macrófagos e neutrófilos, remodelação óssea e neovascularização. Essas alterações tiveram variações significativas conforme o grupo experimental.

Em relação à osteointegração avaliando deposição de fibras colágenas, remodelação óssea, preenchimento das lacunas osteocíticas, incorporação do enxerto, infiltrado inflamatório e vascularização, após análise estatística pelo teste de Mann-Whitney no grupo laser de aloenxerto ósseo triturado com 70 dias houve diferença estatística significativa nos quesitos remodelação óssea ( $p = 0,008$ ) e vascularização ( $p = 0,032$ ) quando comparado ao grupo controle de aloenxerto ósseo triturado alógeno (Tabela 4 e 5), nos demais grupos analisados também pelo teste de Mann-Whitney não houve diferença estatística significativa. Quantitativamente os grupos irradiados com laser, mostraram resultados melhores.

#### 4.1.1 Grupo Laser (Figura 8a) e Grupo Controle (Figura 8b) de Aloenxerto Ósseo Triturado de 35 dias (Tabela 3)

Nos grupos laserterapia e controle ocorreu a deposição de fibras colágenas de forma moderada em todo o espaço medular. Remodelação óssea foi visualizada de forma leve a moderada no grupo controle e moderada no grupo laser. As lacunas osteocíticas, tanto nos grupos laser como nos grupos controle, estavam preenchidas em sua maioria. Infiltrado de células mononucleares foram visualizados nos espaços medulares, sendo de intensidade leve no grupo irradiado e variando de moderada a acentuada no grupo controle.

Figura 8: a) Grupo Laser de Aloenxerto Ósseo Triturado de 35 dias; b) Grupo Controle de Aloenxerto Ósseo Triturado de 35 dias. 1) Osso Receptor, Medula Óssea Normal; 2) Área Enxertada; 3) Remodelação Óssea; 4) Infiltrado Inflamatório. H&E Objetiva 4X



Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Tabela 3: Grupo Controle (C 35d) e Grupo Laser (L 35d) de Aloenxerto Ósseo Triturado de 35 dias

	Deposição fibras colágenas	Remodelação óssea	Preenchimento lacunas osteocíticas	Incorporação do enxerto	Infiltrado inflamatório	Vascularização
1- C1 aloenxerto 35d	2	2	2	2	3	2
2- C2 aloenxerto 35d	2	1	1	1	2	2
3- C3 aloenxerto 35d	2	2	2	2	2	2
4- C4 aloenxerto 35d	2	1	2	2	3	2
5- C5 aloenxerto 35d	2	2	2	2	2	2
6- L1 aloenxerto 35d	3	2	2	2	1	2
7- L2 aloenxerto 35d	2	2	2	2	1	2
8- L3 aloenxerto 35d	2	2	1	2	2	2
9- L4 aloenxerto 35d	2	2	2	2	1	2
10- L5 aloenxerto 35d	2	2	2	2	2	2

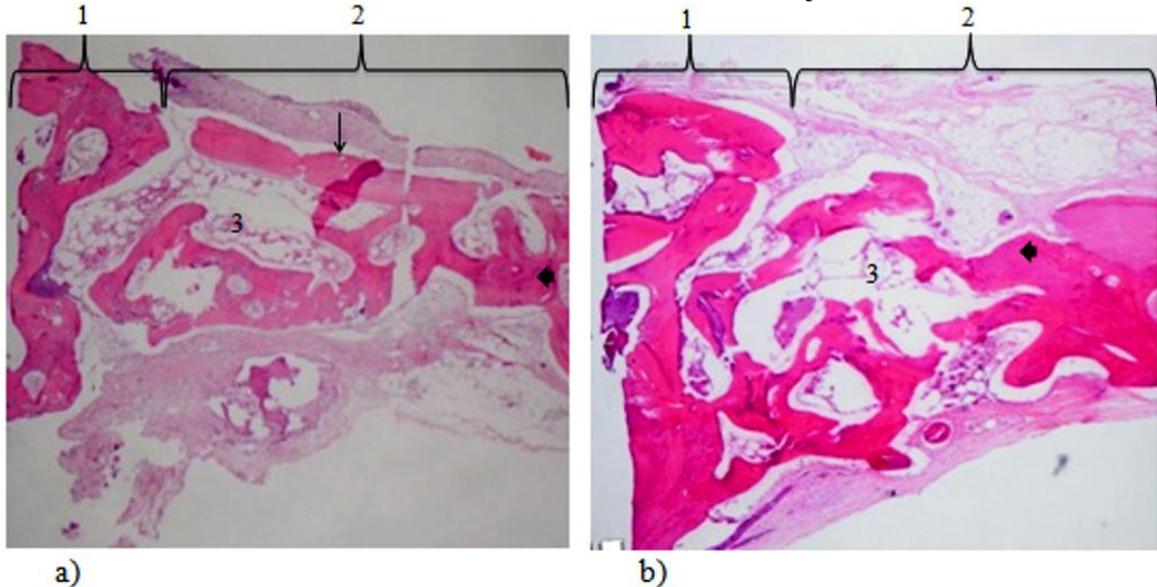
Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

#### 4.1.2 Grupo Laser (Figura 9a) e Grupo Controle (Figura 9b) de Aloenxerto Ósseo Triturado de 70 dias (Tabelas 4 e 5)

As fibras colágenas estavam presentes em quantidade leve nos espaços medulares no grupo laser e controle. Remodelação óssea foi observada de forma acentuada no grupo laser e moderada no grupo controle com diferença estatística significativa. As lacunas ósseas no grupo laser estavam em sua maioria preenchidas por osteócitos de maneira acentuada e no

grupo controle este preenchimento foi moderado e acentuado. A vascularização mostrou-se acentuada no grupo laser e moderada no grupo controle tendo esta variável diferença estatística significativa entre os referidos grupos.

Figura 9: **a)** Grupo Laser de Aloenxerto Ósseo Triturado de 70 dias; **b)** Grupo Controle de Aloenxerto Ósseo Triturado de 70 dias. **1)** Osso Receptor, Medula Óssea Normal; **2)** Área enxertada; **3)** Proliferação de Fibras Colágenas; **Seta:** Lacunas Ósseas Vazias; **Cabeça de Seta:** Lacunas Ósseas Preenchidas. H&E objetiva 4X



Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Tabela 4: Grupo Controle (C 70d) e Grupo Laser (L 70d) de Aloenxerto Ósseo Triturado de 70 dias

	Deposição fibras colágenas	Remodelação óssea	Preenchimento lacunas osteocíticas	Incorporação do enxerto	Infiltrado inflamatório	Vascularização
11- C1 aloenxerto 70d	1	2	3	3	0	2
12- C2 aloenxerto 70d	1	2	2	3	1	2
13- C3 aloenxerto 70d	1	2	2	3	1	2
14- C4 aloenxerto 70d	1	2	2	3	0	2
15- C5 aloenxerto 70d	1	2	3	3	0	2
16- L1 aloenxerto 70d	1	3	3	3	0	3
17- L2 aloenxerto 70d	1	3	3	3	0	2
18- L3 aloenxerto 70d	1	3	2	3	1	3
19- L4 aloenxerto 70d	1	3	3	3	1	3
20- L5 aloenxerto 70d	1	3	3	3	0	3

Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Tabela 5: Análise Estatística pelo Teste de Mann-Whitney do Grupo Laser e Grupo Controle de Aloenxerto Ósseo Triturado de 70 dias

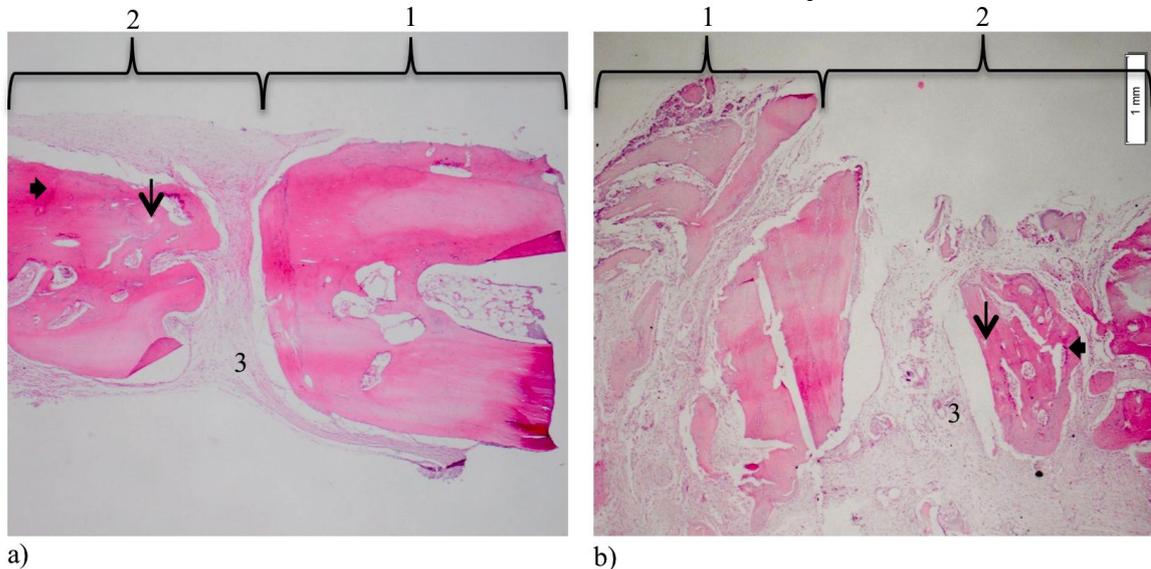
	Tratamento	N	Posto Médio	Mann-Whitney U	Valor - p
Deposição fibras colágenas	Controle	5	5,50	12,500	1,00
	Laser	5	5,50		
	Total	10			
Remodelação óssea	Controle	5	3,00	0,000	0,008
	Laser	5	8,00		
	Total	10			
Preenchimento lacunas osteocíticas	Controle	5	4,50	7,500	0,310
	Laser	5	6,50		
	Total	10			
Incorporação do enxerto	Controle	5	5,50	12,500	1,000
	Laser	5	5,50		
	Total	10			
Infiltrado inflamatório	Controle	5	5,50	12,500	1,000
	Laser	5	5,50		
	Total	10			
Vascularização	Controle	5	3,50	2,500	0,032
	Laser	5	7,50		
	Total	10			

Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

#### 4.1.3 Grupo Laser (Figura 10a) e Grupo Controle (Figura 10b) de Autoenxerto Ósseo Triturado de 35 dias (Tabela6)

Para os dois grupos a deposição de fibras colágenas variou de leve a moderada intensidade. Ocorreu remodelação óssea de intensidade moderada no grupo laser e leve a moderada no grupo controle. As lacunas do grupo laser estavam preenchidas por osteócitos e a incorporação do enxerto de maneira acentuada já no grupo controle o preenchimento e a incorporação do enxerto foi de moderado a acentuado. Infiltrado de macrófagos foram observados de forma leve a moderada nos dois grupos. Vascularização mais acentuada foi observada no grupo laser quando comparado ao grupo controle.

Figura 10: a) Grupo Laser de Autoenxerto Ósseo Triturado de 35 dias; b) Grupo Controle de Autoenxerto ósseo Triturado de 35 dias. 1) Osso Receptor, Medula óssea normal; 2) Área Enxertada; 3) Proliferação de Fibras Colágenas. **Seta:** Lacunas Ósseas Vazias; **Cabeça de Seta:** Lacunas Ósseas Preenchidas. H&E Objetiva 4X



Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Tabela 6: Grupo Laser (L 35d) e Grupo Controle (C 35d) de Autoenxerto Ósseo Triturado de 35 dias

	Deposição fibras colágenas	Remodelação óssea	Preenchimento lacunas osteocíticas	Incorporação do enxerto	Infiltrado inflamatório	Vascularização
21-C1 autoenxerto 35 d	1	2	3	3	0	2
22-C2 autoenxerto 35 d	2	1	2	2	0	2
23-C3 autoenxerto 35 d	2	2	3	3	0	2
24-C4 autoenxerto 35 d	1	2	2	3	0	2
25-C5 autoenxerto 35 d	2	2	2	3	0	2
27-L1 autoenxerto 35 d	2	2	3	3	0	3
28-L2 autoenxerto 35 d	1	2	3	3	0	2
29-L3 autoenxerto 35 d	2	2	3	3	0	3
30-L4 autoenxerto 35 d	2	2	3	3	0	3
31-L5 autoenxerto 35 d	2	2	3	3	0	2

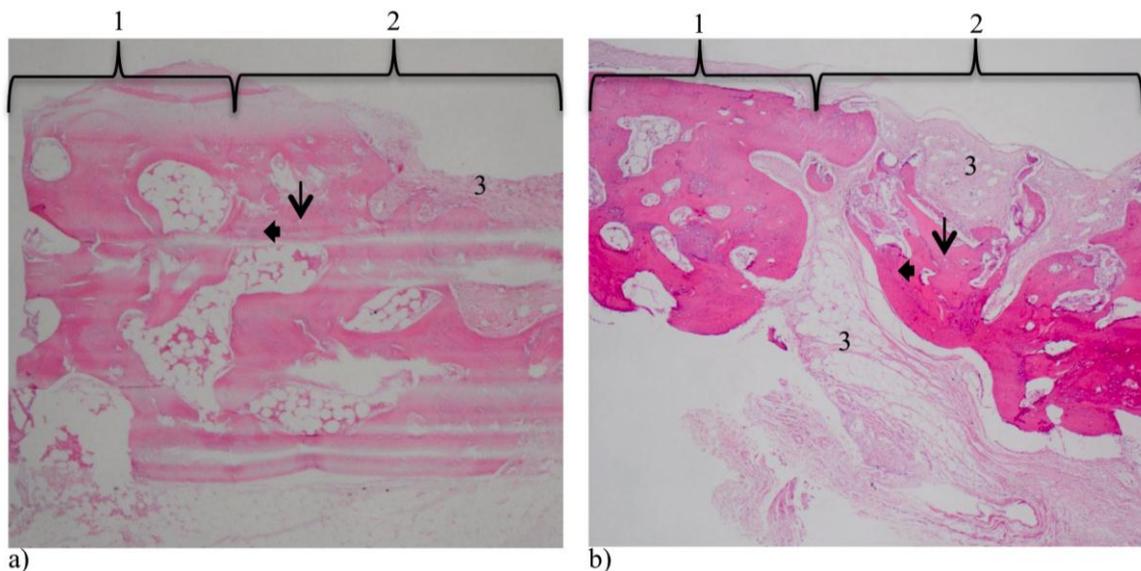
Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

#### 4.1.4 Grupo Laser (Figura 11a) e Grupo Controle (Figura 11b) de Autoenxerto Ósseo Triturado com 70 dias (Tabela7)

No grupo laser e controle a deposição de fibras colágenas foi de intensidade leve a moderada. A remodelação óssea ocorreu de forma moderada a acentuada em ambos os grupos. O preenchimento das lacunas osteocíticas e a incorporação dos enxertos do grupos

laser e controle estavam acentuadas com exceção de um único animal do grupo controle que estava moderada. Ausência de infiltrado inflamatório nos dois grupos com exceção de um animal em cada grupo que apresentaram infiltrado inflamatório leve.

Figura 11: **a)** Grupo Laser de Autoenxerto Ósseo Triturado de 70 dias; **b)** Grupo Controle de Autoenxerto Ósseo Triturado de 70 dias. **1)** Osso Receptor, Medula Óssea Normal; **2)** Área Enxertada; **3)** Proliferação de Fibras Colágenas; **Seta:** Lacunas Ósseas Vazias; **Cabeça de seta:** Lacunas ósseas preenchidas. H&E Objetiva 4X



Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Tabela 7: Grupo de Autoenxerto Ósseo Triturado com 70 dias Grupo Controle (C auto 70) e com Laserterapia (L auto 70)

	Deposição fibras colágenas	Remodelação óssea	Preenchimento lacunas osteocíticas	Incorporação do enxerto	Infiltrado inflamatório	Vascularização
32-C1 autoenxerto 70d	1	2	3	3	0	3
33-C2 autoenxerto 70d	1	3	3	3	0	3
34-C3 autoenxerto 70d	1	2	3	3	0	3
35-C4 autoenxerto 70d	2	3	2	2	1	2
36-C5 autoenxerto 70d	2	3	3	3	0	2
37-L1 autoenxerto 70d	2	2	3	3	1	3
38-L2 autoenxerto 70d	1	3	3	3	0	3
39-L3 autoenxerto 70d	1	3	3	3	0	3
40-L4 autoenxerto 70d	1	3	3	3	0	3
41-L5 autoenxerto 70d	1	3	3	3	0	3

Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

#### 4.1.5 Grupo Controle e Grupo Laser de Coágulo Sanguíneo de 35 e 70 dias (Tabelas 8 e 9)

Nos grupos controle e laser de coágulos sanguíneos a remodelação óssea foi quali e quantitativamente inferior aos grupos enxertados. Nos grupos de 35 dias a deposição de fibras colágenas e remodelação óssea se deu de maneira leve a moderada no grupo laser e leve no grupo controle. O preenchimento das lacunas osteocíticas e a incorporação do enxerto nos grupos laser e controle foram leves ou simplesmente não ocorreram. O infiltrado inflamatório e a vascularização ocorreram de forma leve a moderada nos dois grupos.

No grupo de 70 dias o preenchimento das lacunas osteocíticas e a vascularização se deram de maneira moderada a acentuada. A deposição de fibras colágenas, remodelação óssea, incorporação do enxerto e infiltrado inflamatório mostraram resultados ligeiramente melhores que no grupo de 35 dias.

Tabela 8: Grupo Controle (Coágulo C 35) e Grupo Laser (Coágulo L 35) e de Coágulo Sanguíneo 35 dias

	Deposição fibras colágenas	Remodelação óssea	Preenchimento lacunas osteocíticas	Incorporação do enxerto	Infiltrado inflamatório	Vascularização
42- Coágulo C 35	1	1	1	1	1	2
43- Coágulo C 35	1	1	0	0	2	1
44- Coágulo C 35	1	1	0	0	2	1
45- Coágulo C 35	1	1	1	1	2	2
46- Coágulo C 35	1	1	0	0	2	1
47- Coágulo L 35	2	2	1	1	2	1
48- Coágulo L 35	1	1	0	0	1	2
49- Coágulo L 35	2	2	1	1	2	2
50- Coágulo L 35	1	1	1	1	1	2
51- Coágulo L 35	1	1	0	0	2	2

Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Tabela 9: Grupo Controle (Coágulo C 70) e Grupo Laser (Coágulo L 70) de Coágulo Sanguíneo 70 dias

	Deposição fibras colágenas	Remodelação óssea	Preenchimento lacunas osteocíticas	Incorporação do enxerto	Infiltrado inflamatório	Vascularização
52- Coágulo C 70	1	2	3	1	0	3
53- Coágulo C 70	1	1	2	2	1	2
54- Coágulo C 70	1	1	2	2	1	2
55- Coágulo C 70	1	2	2	1	1	2
56- Coágulo C 70	1	1	2	2	2	2
57- Coágulo L 70	1	3	3	2	0	3
58- Coágulo L 70	1	2	2	2	1	3
59- Coágulo L 70	1	2	3	3	0	3
60- Coágulo L 70	1	2	3	2	0	2
61- Coágulo L 70	1	3	2	2	1	2

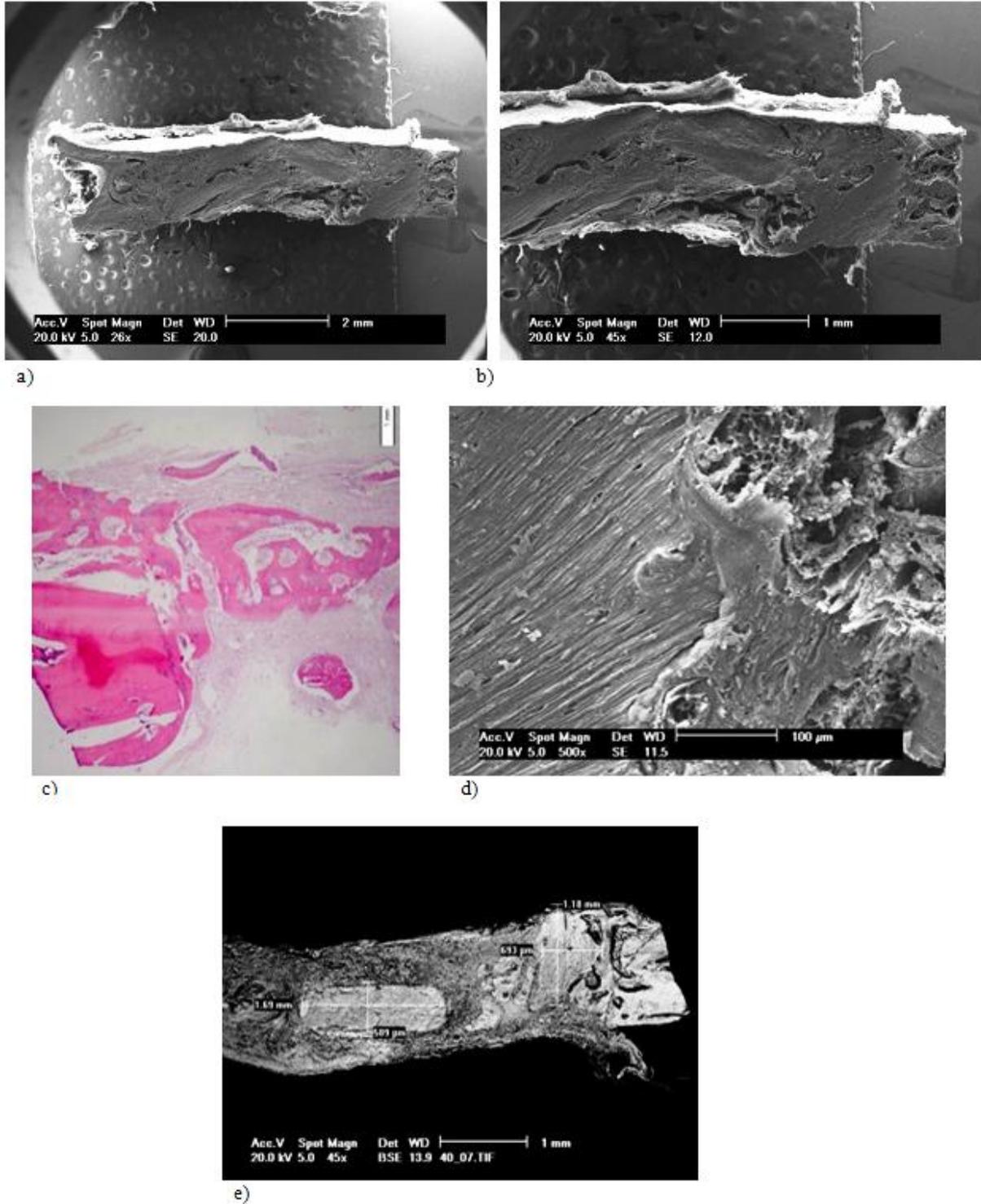
Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

#### 4.2 AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DOS ENXERTOS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E MICROSCOPIA ÓPTICA

Observa-se através do MEV com aumento de 26X, 45X, 250X e 500X (figuras: 12 a, b, d, e; 13 a, c; 14 a, b, c, d; 15 a, b, c; 16 a, b, c; 17 a, b, c; 18 a, c; 19 a, c; 20 c; 21 c; 22 c; 23 c) e da Microscopia Óptica aumento de 40X e 100X (figuras: 12 c; 13 b; 14 e; 15 c; 16 d; 17 d; 18 b, d; 19 b, d; 20 a, b; 21 a, b; 22 a, b; 23 a, b) que ocorreu a incorporação dos enxertos na interface com a área receptora em todas as amostras do experimento. Nas bordas 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 e quanto mais para o centro do enxerto menos intensa foi a remodelação.

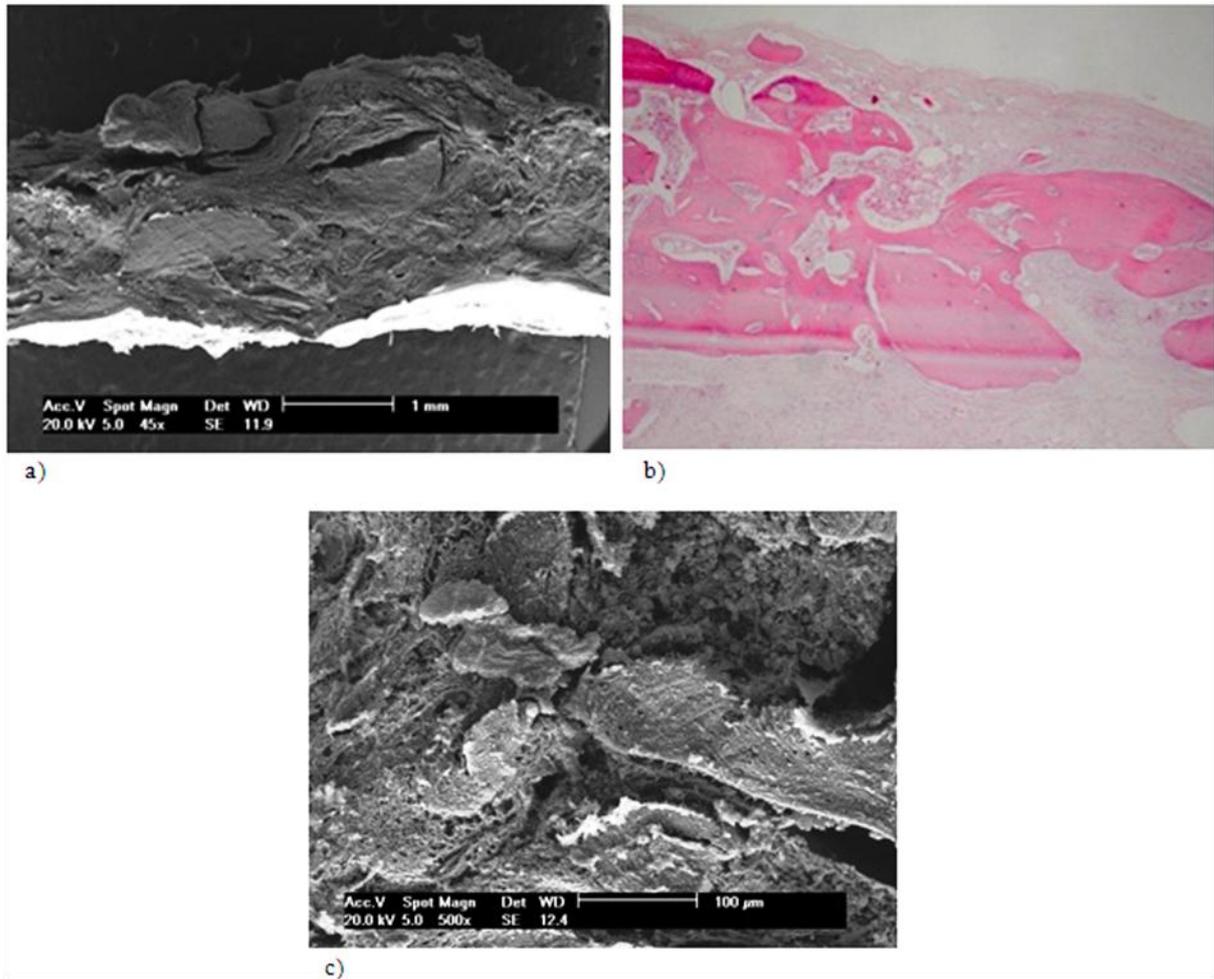
A análise demonstrou a propriedade osteocondutiva dos aloenxertos ósseos triturados processados por congelamento profundo, que preservou suas características estruturais, e a matriz óssea, servindo como arcabouço para a migração de vasos sanguíneos e células a partir do hospedeiro para o enxerto.

Figura 12: **a)** Imagem MEV 26X modo SE; **b)** detalhe em 45X da Imagem (a); **c)** Imagem H&E Objetiva 4X; **d)** Imagem MEV 500X, Área de União entre Enxerto e Osso Receptor; **e)** Imagem MEV 45X modo BSE, medindo Partículas de Enxerto. Grupo Laser de Aloenxerto Ósseo Triturado com 35 dias



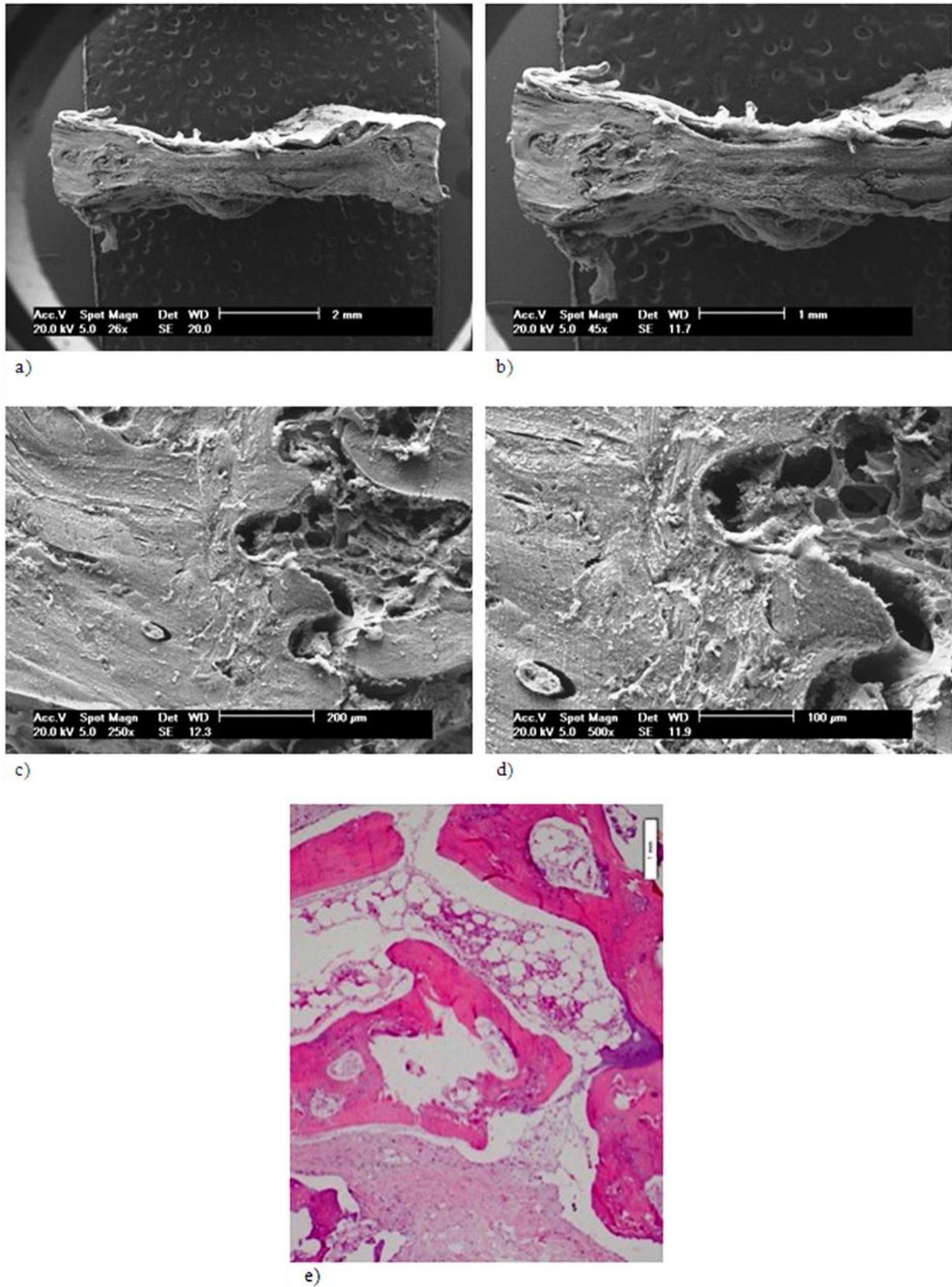
Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Figura 13: a) Imagem MEV 45X modo SE; b) Imagem H&E Objetiva 4X; c) Imagem MEV 500X, Área de União entre Enxerto e Osso Receptor. Grupo Controle de Aloenxerto Ósseo Triturado com 35 dias



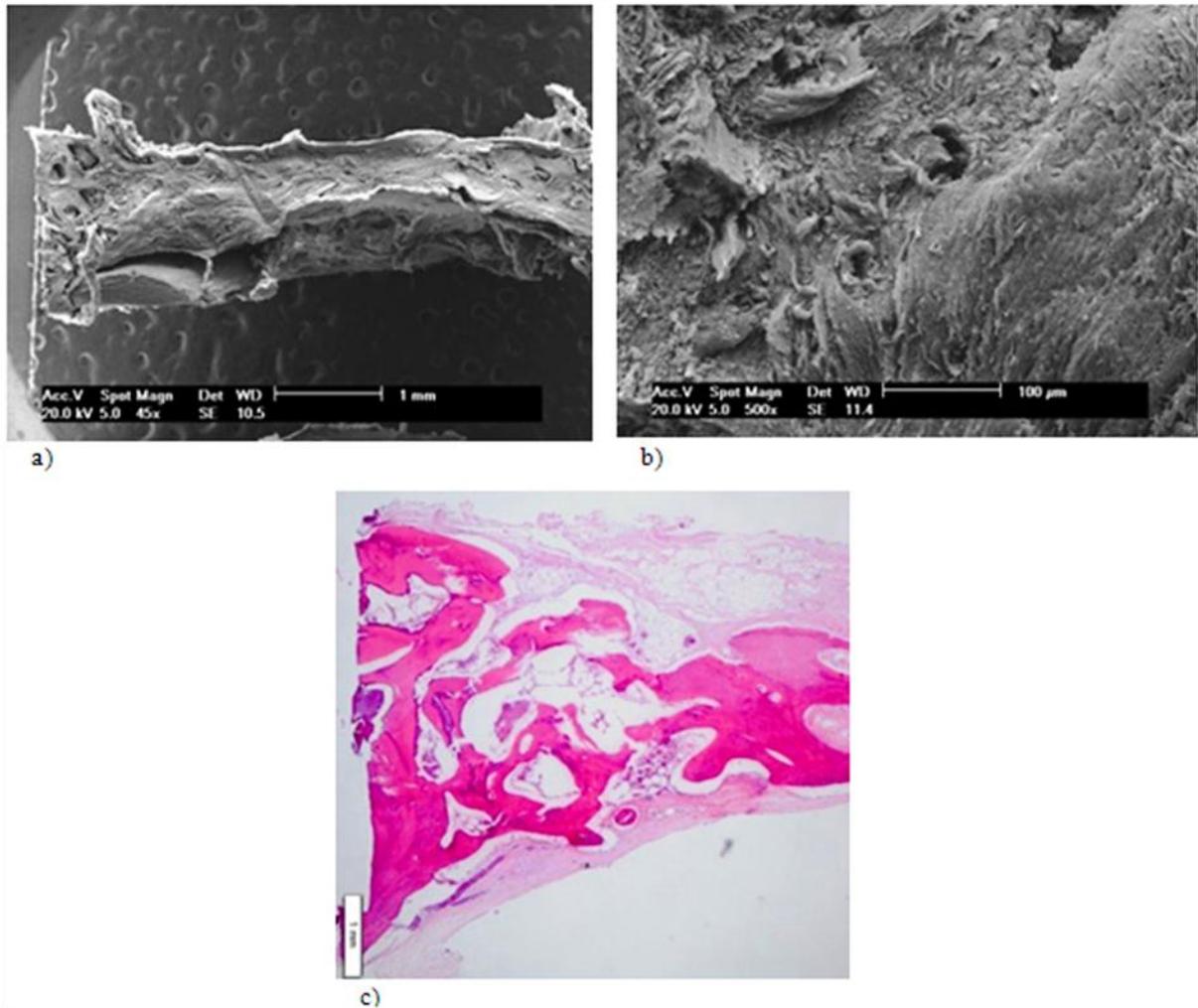
Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Figura 14: **a)** Imagem MEV 26X modo SE e Imagens; **b); c) e d)** Detalhe em 45X, 250X e 500X respectivamente da Imagem (a); **e)** Imagem H&E Objetiva 10X. Grupo Laser de Aloenxerto Ósseo Triturado com 70 dias



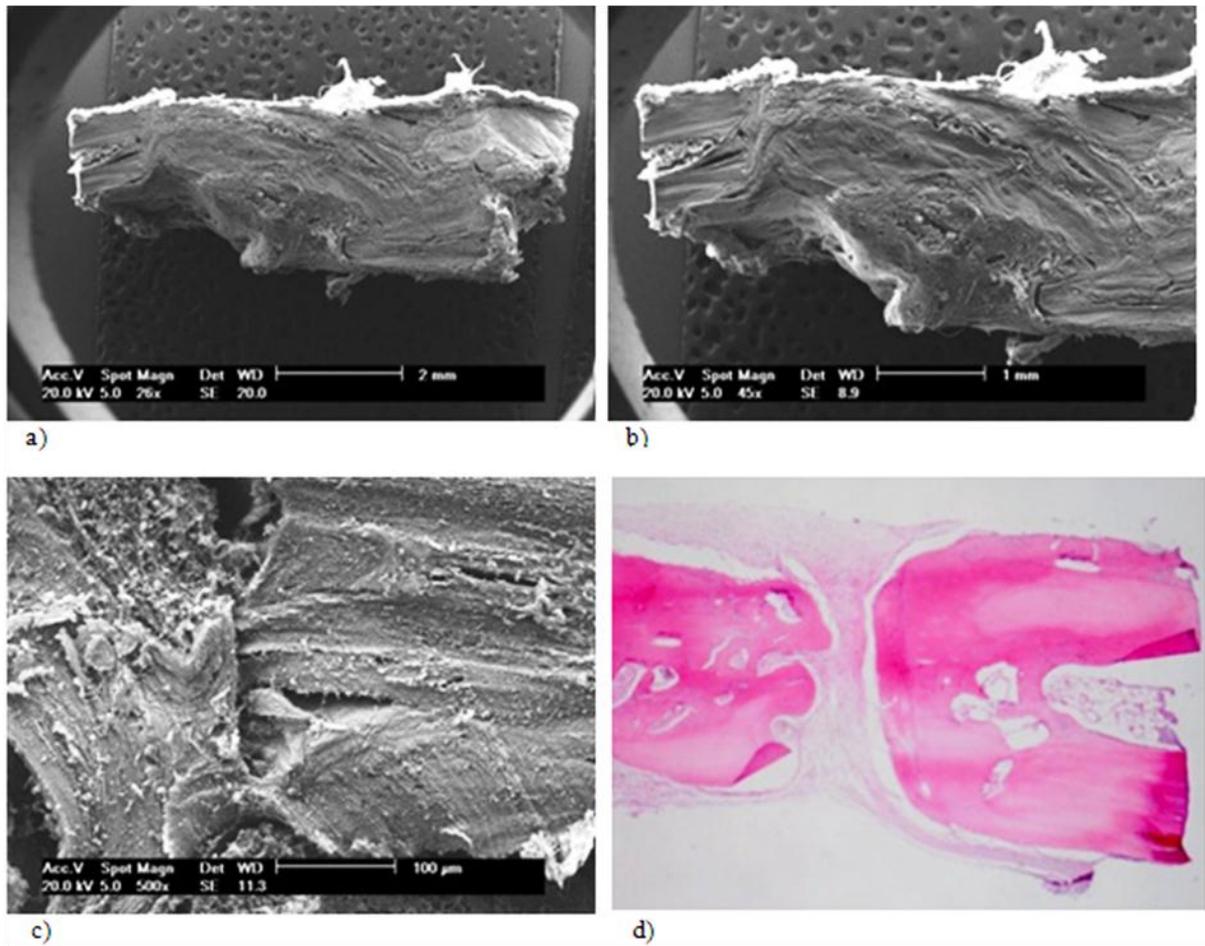
Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Figura 15: **a)** Imagem MEV 45X modo SE e **b)** Detalhe 500X da Imagem (a). Imagem H&E Objetiva 4X; **c)** Imagem MEV 500X. Grupo Controle de Aloenxerto Ósseo Triturado com 70 dias



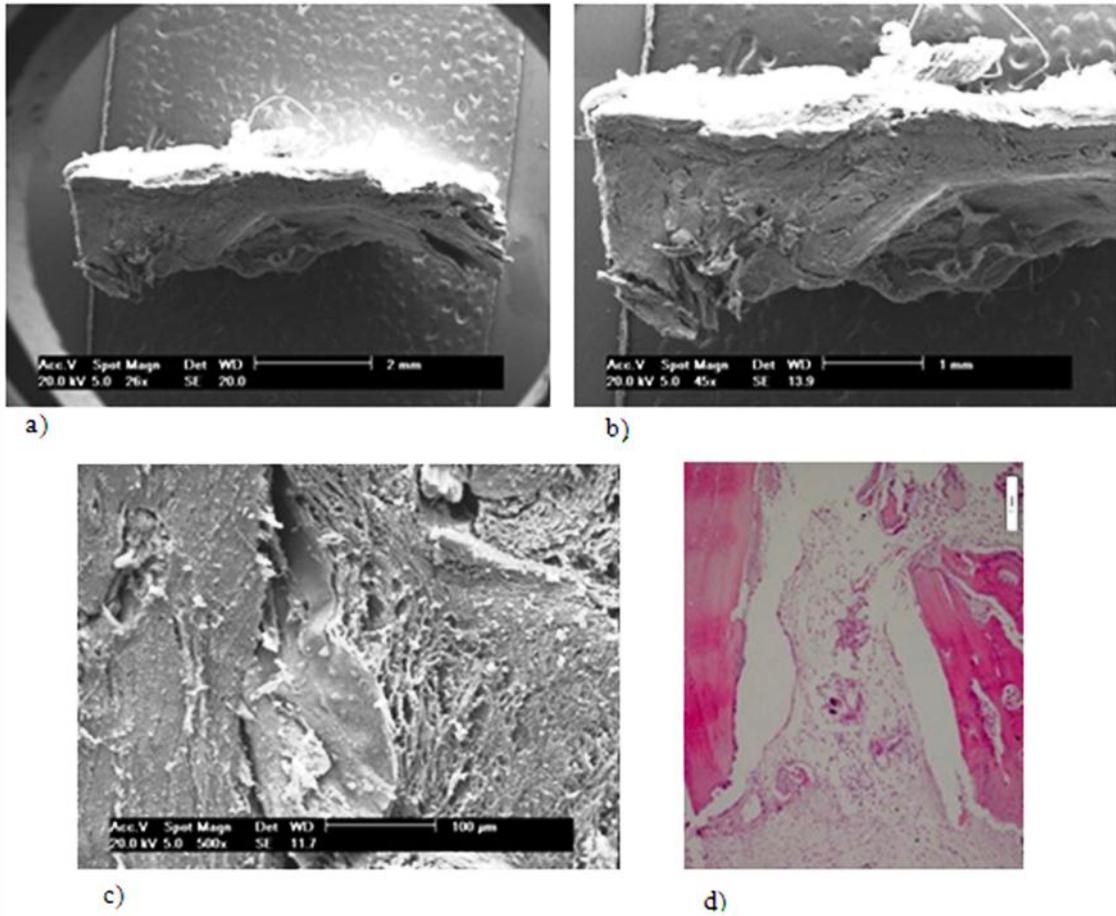
Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Figura 16: a) Imagem MEV 26X modo SE; b) e c) Detalhe 45X e 500X respectivamente da Imagem (a); d) Imagem H&E Objetiva 4X. Grupo Laser de Autoenxerto Ósseo Triturado com 35 dias



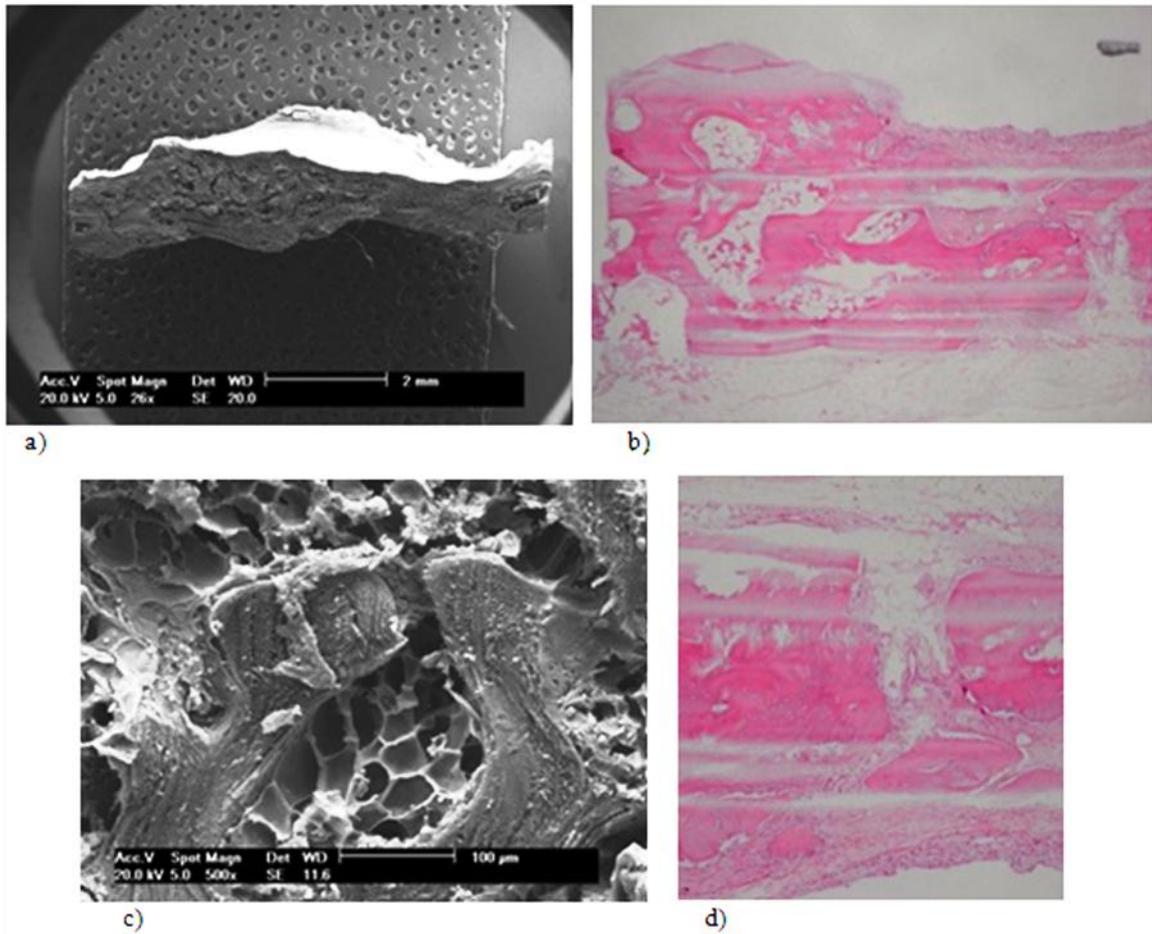
Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Figura 17: **a)** Imagem MEV 26X modo SE; **b)** e **c)** Detalhe 45X e 500X respectivamente da Imagem (a); **d)** Imagem H&E Objetiva 10X. Grupo Controle de Autoenxerto Ósseo Triturado com 35 dias



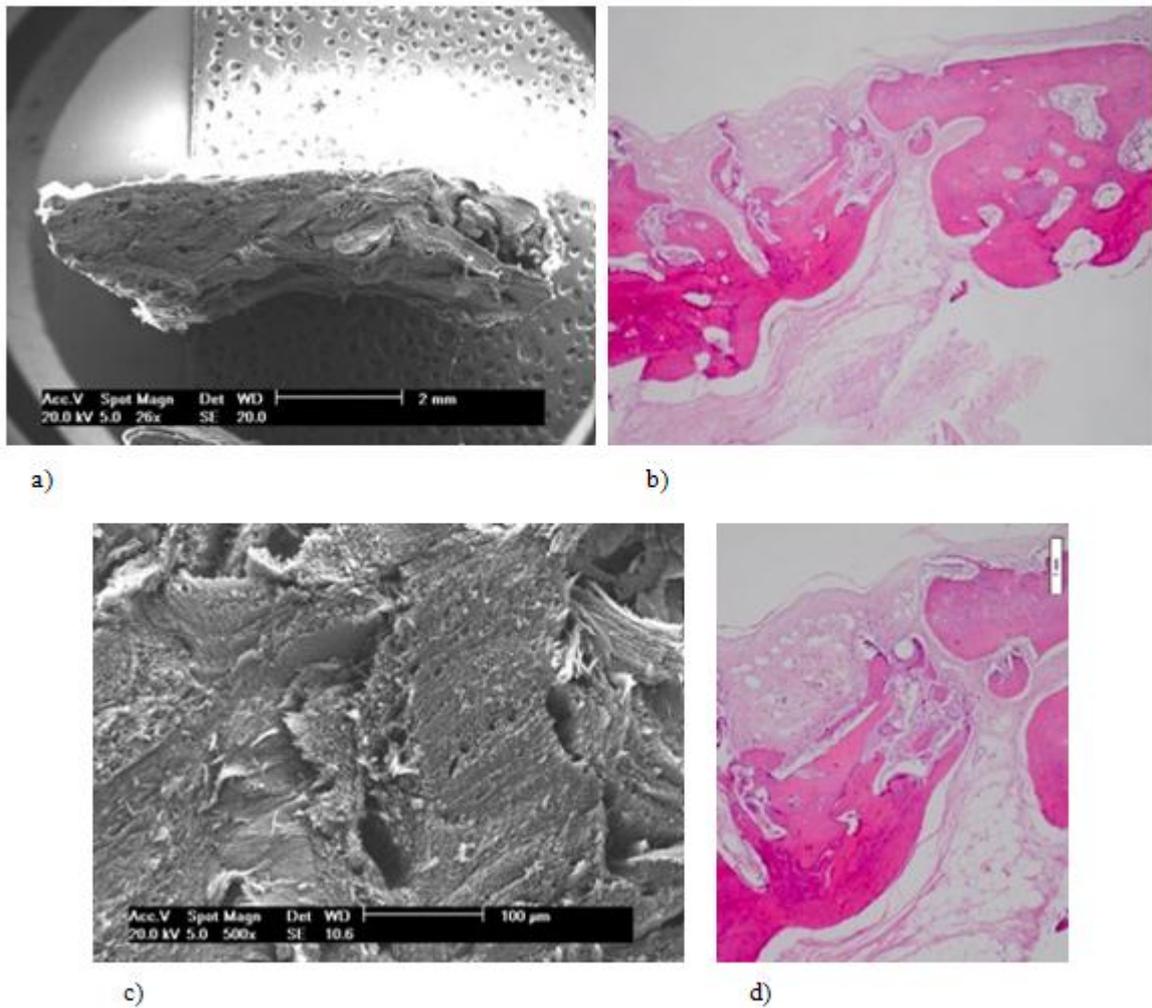
Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Figura 18: a) Imagem MEV 26X modo SE; b) Imagem H&E Objetiva 4X; c) Imagem MEV 500X modo SE; d) Imagem H&E Objetiva 10X. Grupo Laser de Autoenxerto Ósseo Triturado com 70 dias



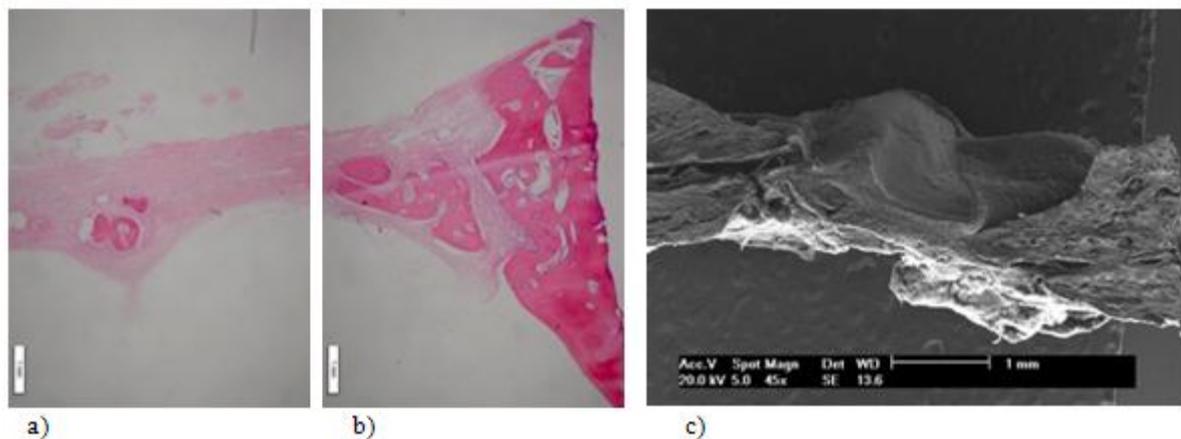
Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Figura 19: **a)** Imagem MEV 45X modo SE; **b)** Imagem H&E Objetiva 4X; **c)** Imagem MEV 500X modo SE; **d)** Imagem H&E Objetiva 10X. Grupo Controle de Autoenxerto Ósseo Triturado com 70 dias



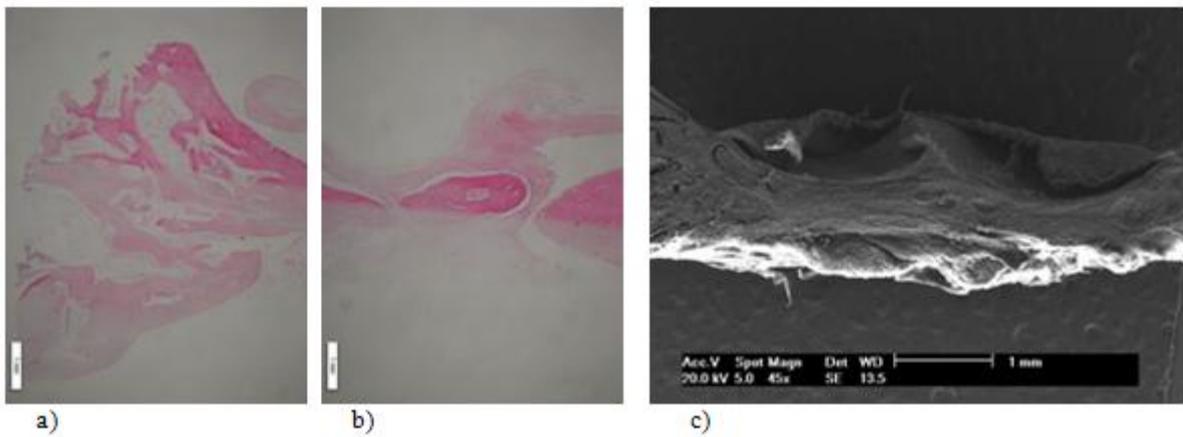
Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Figura 20: **a)** e **b)** Imagem H&E Objetiva 4X; **c)** Imagem MEV 45X modo SE. Grupo Laser Coágulo Sanguíneo com 35 dias



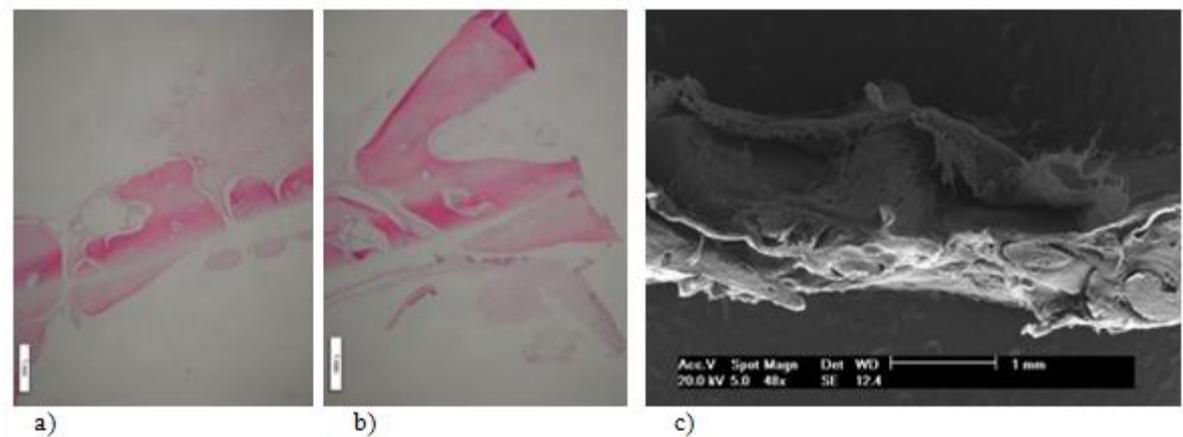
Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Figura 21: a) e b) Imagem H&E Objetiva 4X; c) Imagem MEV 45X modo SE. Grupo Controle Coágulo Sanguíneo com 35 dias



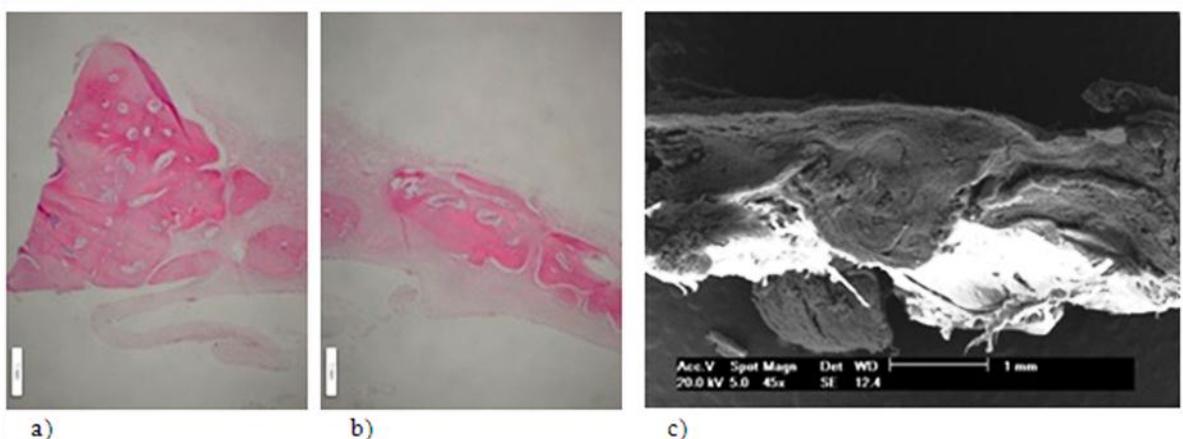
Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Figura 22: a) e b) Imagem H&E Objetiva 4X; c) Imagem MEV 45X modo SE. Grupo Laser Coágulo Sanguíneo com 70 dias



Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137

Figura 23: a) e b) Imagem H&E Objetiva 4X; c) Imagem MEV 45X modo SE. Grupo Controle Coágulo Sanguíneo com 70 dias



Fonte: CEUA/PUCRS 09/00137



*Discussão*

---

## 5 DISCUSSÃO

Apesar da morbidade cirúrgica, o enxerto ósseo autógeno é considerado, na comunidade científica, padrão ouro para a reconstrução óssea dos maxilares, devido à sua inerente osteogenicidade, osteocondutividade e osteoindutividade, pois carrega um complemento de células, principalmente os osteoblastos, capazes de assegurar rápida incorporação do enxerto no sítio de implantação<sup>15,30,44,45,56</sup>. Entretanto, inúmeros artigos de revisão de literatura e relato de casos clínicos citam o enxerto alógeno como viável para reconstruções ósseas maxilofaciais, sendo indicado nos casos nos quais não se tem áreas doadoras suficientes e para indivíduos que não querem ser submetidos a procedimentos de maior morbidade<sup>45,49</sup>, considerando preocupantes os procedimentos que envolvam enxerto autógeno com áreas doadoras intraorais, em decorrência da possibilidade de parestesia, desvitalização dentária, recessão gengival, desconforto pós-operatório, infecção e quantidade limitada de tecido na região doadora<sup>6</sup>.

Enquanto os aloenxertos ósseos são osteocondutivos e fracamente osteoindutivos, os autoenxertos são osteogênicos, osteoindutivos e osteocondutivos. Nos autoenxertos não há rejeição do hospedeiro e tampouco transmissão de doenças, mas há retenção de osteoblastos viáveis. Já os aloenxertos possuem maior disponibilidade óssea através dos bancos de ossos e tecidos, de formas customizadas, não sendo necessário procedimento cirúrgico adicional. Os autoenxertos possuem desvantagens como morbidade e disponibilidade limitadas, enquanto os aloenxertos correm risco de transmissão de doenças, sendo imunogênicos, não osteogênicos<sup>5,16,20,101</sup>.

Mesmo com maior potencial imunogênico, todos os autores pesquisados relataram que o pós-operatório de pacientes submetidos a enxerto de osso alógeno foi menos traumático em relação à enxertia autógena e que os casos que apresentaram falhas pareciam estar relacionados com causas não imunológicas, como erro de técnica ou infecção bacteriana. Não houve grandes diferenças clínicas ou radiográficas em relação à enxertia autógena<sup>11</sup>.

O enxerto alógeno é uma opção que está sendo utilizada de modo crescente na Odontologia para reconstruções das bordas alveolares e enxertias dos seios maxilares. Percebe-se que os aloenxertos sofrem alterações biológicas que qualitativamente similares aos autoenxertos, porém, sua incorporação na interface de união enxerto/hospedeiro, ocorre de forma mais lenta, devido à maior reação inflamatória inicial e à menor revascularização<sup>28,35,49,102</sup>. Esse atraso de cerca de três meses no período de incorporação do aloenxerto deve ser levado em conta no momento da colocação de implantes

osseointegrados<sup>16</sup>. A extensão da formação de um novo osso entre o enxerto e a junção do leito receptor está correlacionada à revascularização e ao tempo de cicatrização<sup>29</sup>.

Os enxertos ósseos particulados são rapidamente revascularizados, liberam uma quantidade maior de fatores de diferenciação e de crescimento nos estágios iniciais da regeneração, assim como exibem uma atividade osteoclástica mais intensa, resultando em uma maior reabsorção quando comparados aos enxertos em bloco<sup>58</sup>.

Implantes instalados em seios maxilares enxertados com osso particulado mostraram uma taxa de sobrevivência superior àqueles em que a instalação ocorreu em seios com enxerto de osso em bloco, bem como implantes com superfície rugosa apresentaram taxas de sucesso superiores em relação aos de superfície lisa quando das suas instalações em seios maxilares enxertados. A taxa de sucesso dos implantes instalados em regiões de seios maxilares enxertados foi superior aos implantes instalados em regiões posteriores sem enxertia em seio maxilar<sup>103</sup>.

Nesta pesquisa foi utilizado o modelo animal coelho, assim como nos trabalhos de Khadra et al. (2004)<sup>74</sup>, Lopes et al. (2005)<sup>90</sup>, Lopes et al. (2007)<sup>91</sup> e Campanha et al. (2010)<sup>96</sup>, devido à facilidade de manuseio, à disponibilidade e pela necessidade de uma área de superfície óssea maior para se avaliar o efeito da laserterapia em enxertos ósseos triturados (particulados). Para a retirada e a implantação de autoenxerto e aloenxertos triturados foram necessárias três áreas de 8mm de diâmetro no mesmo animal, sendo utilizada a calota craniana por ter uma superfície maior que regiões como o fêmur e a tíbia usado na maioria dos trabalhos com laserterapia na biomodulação da regeneração óssea para a realização de defeitos ósseos com pequenos diâmetros, de 1 a 5mm<sup>4,82,83,88-89,92,94,104</sup>.

Considerando o efeito sistêmico do laser, foram empregados grupos de animais irradiados e não irradiados (controle), tal como na maioria das pesquisas. Nicola et al. (2003)<sup>87</sup>, Khadra et al. (2004)<sup>74</sup>, e Weber et al. (2006)<sup>4</sup> relatam que os efeitos sistêmicos da laserterapia não podem ser descartados e referem que, por isso, alguns estudos falharam em revelar efeitos significantes da irradiação quando comparados com controles contralaterais no mesmo animal. Jakse et al. (2007)<sup>79</sup> não confirmaram o efeito positivo da laserterapia no enxerto ósseo autógeno, porém o estudo apresenta um viés, já que 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. O estudo de Dörtbudak, Haas e Mallath-Pokorny (2002)<sup>86</sup> e de Merli et al. (2005)<sup>82</sup> também apresentam um possível viés que é a ação sistêmica do laser, pois os sítios irradiados e os controle eram no mesmo animal.

Quanto ao comprimento de onda e o tipo de laser empregado, a literatura pesquisada é bem diversificada. Alguns pesquisadores utilizam laser com comprimento de onda de 680-690nm, sem relatar o tipo de laser<sup>79,84,86</sup>. A maioria dos artigos pesquisados utilizou laser de arseneto de gálio-alumínio (AsGaAl) com comprimento de onda de 830nm<sup>4,73,74,83,88-93,95,96</sup> ou AsGaAl com comprimento de onda de 790nm<sup>94</sup>, AsGaAl com  $\lambda$  670nm<sup>83</sup>, AsGaAl  $\lambda$  660nm<sup>87</sup> e também com laser de HeNe com comprimento de onda de 632,8nm<sup>104-106</sup>. Nesta pesquisa utilizou-se o laser de arseneto de gálio-alumínio (AsGaAl) com comprimento de onda de 830nm, como na maioria da literatura pesquisada, devido ao tamanho do defeito (8mm), no qual foi realizado o enxerto ósseo triturado, ocupando um volume significativo onde a luz laser infravermelha penetrou profundamente nos tecidos<sup>73,90,91</sup>, o que pode se estender por até 2 a 3cm de penetração<sup>74</sup>, especialmente em tecidos subcutâneos<sup>4</sup>.

Os períodos de cicatrização óssea foram bastante variados nos estudos com laserterapia pesquisados em animais. Em ratos, esse período variou de 7 a 40 dias, em ovelhas, de 35 a 112 dias, e em coelhos de 15 a 56 dias. No presente estudo, realizado com coelho, foi avaliada a incorporação dos enxertos ósseos em dois períodos distintos de 35 e 70 dias. Campanha et al., (2010)<sup>106</sup> afirmaram que a cicatrização óssea em coelhos ocorre três vezes mais rápida que a que ocorre em humanos. Nesses períodos de 35 dias (5 semanas) e 70 dias (10 semanas), extrapolando para humanos, equivalem à cicatrização óssea de aproximadamente 15 semanas (3 a 4 meses) e 30 semanas (7 a 8 meses).

Em relação às doses totais utilizadas, essas variaram bastante nas pesquisas em animais revisadas na literatura científica. As doses foram de 6 J/cm<sup>2</sup> a 602 J/cm<sup>2</sup>. Em coelhos, variaram de 86 J/cm<sup>2</sup> a 602 J/cm<sup>2</sup>. Este estudo utilizou como dose total 128 J/cm<sup>2</sup>, pois os resultados das duas pesquisas em coelhos de Lopes et al. (2005 e 2007)<sup>90,91</sup>, empregando a mesma metodologia, diferenciando somente a dose total 86 J/cm<sup>2</sup> no trabalho de 2005 e 602 J/cm<sup>2</sup> em 2007, tiveram resultados semelhantes.

Em relação ao número de aplicações, as publicações sobre o tema relatam de uma a 14 irradiações com laser. Nesta pesquisa foram realizadas oito aplicações, sendo uma no pós-operatório imediato e mais sete a cada 48 horas, semelhante aos trabalhos de Pinheiro et al. (2003)<sup>88</sup>, Gerbi et al. (2005)<sup>89</sup>, Weber et al. (2006)<sup>4</sup>, Guimarães (2006)<sup>92</sup> e Torres et al. (2008)<sup>94</sup>. Outras pesquisas que realizaram sete aplicações de laserterapia foram Lopes et al. (2005)<sup>90</sup>, Lopes et al. (2007)<sup>91</sup>, Pinheiro et al. (2009)<sup>83</sup> e Campanha et al. (2010)<sup>96</sup>, todas demonstrando os efeitos positivos da biomodulação com laserterapia. Múltiplas irradiações são mais efetivas que uma simples dose, como um fator de formação óssea e crescimento de fibroblastos<sup>82</sup>.

Nesta pesquisa foi observado um aumento da deposição de fibras colágenas nos enxertos triturados alógenos e autógenos irradiados quando comparados com os grupos não irradiados, com exceção dos grupos laser e controle de coágulo sanguíneo (controle negativo), em que houve pouca deposição de fibras colágenas. O aumento da atividade e da proliferação fibroblástica ocasionadas pelo efeito biomodulatório da laserterapia são responsáveis pela maior concentração de fibras colágenas<sup>94,83</sup>, estando de acordo com os trabalhos de Pinheiro et al. (2003)<sup>88</sup>, Lopes et al. (2005)<sup>90</sup> e Lopes et al. (2007)<sup>91</sup>.

Quantitativamente, ocorreu uma predominância da remodelação óssea e vascularização nos grupos irradiados com laser nos enxertos ósseos triturados alógenos, autógenos e coágulos sanguíneos aos 35 e 70 dias em relação ao grupo controle. Aos 70 dias nos enxertos alógenos irradiados com laser, as diferenças por meio da análise estatística, foram significativas qualitativamente nos quesitos remodelação óssea e vascularização, quando comparadas ao grupo controle alógeno não irradiado, concordando com os autores que demonstram uma maior remodelação óssea e vascularização nos grupos em que foi realizada a laserterapia<sup>13,29,83,84,87-93</sup>.

Observou-se um maior preenchimento das lacunas osteocíticas nos grupos irradiados com laser principalmente aos 70 dias nos coágulos sanguíneos e enxertos triturados alógenos e, aos 35 e aos 70 dias, nos triturados autógenos quando comparados aos respectivos grupos controle, demonstrando vitalidade óssea parcial do aloenxerto e a característica osteocondutora do aloenxerto ósseo neste breve período do experimento. Dörtbudak, Haas e Mallath-Pokorny (2002)<sup>86</sup> e Jakse et al. (2007)<sup>79</sup> observaram um maior preenchimento das lacunas osteocíticas de enxertos autógenos nos grupos irradiados com laserterapia de baixa potência ao serem comparados aos grupos controles não irradiados.

Ocorreu também um maior preenchimento das lacunas osteocíticas e maior remodelação óssea nos enxertos triturados autógenos (controle positivo) em relação aos enxertos triturados alógenos, tanto nos grupos irradiados quanto nos controle, provavelmente devido ao transporte de células no enxerto autógeno que se mantiveram viáveis durante o período de incorporação<sup>13,17,30,34</sup>.

Todos os grupos apresentaram incorporação do enxerto ósseo. As características da união do osso alógeno com a área receptora sugerem a aceitação pelo hospedeiro. Devido à aglomeração das partículas do enxerto ósseo triturado, associada ao preenchimento total do defeito ósseo, assim como a uma boa compactação, foi favorecida a boa adaptação do enxerto triturado no defeito da calota craniana do coelho receptor e à intimidade dos enxertos triturados com as células ósseas, assim como a vascularização do leito receptor<sup>25,37,38</sup>. Nas

bordas alveolares e seios maxilares, o aumento médio esperado é de 4 a 5mm em espessura e de 1 a 2mm em altura<sup>9,11</sup>, o que explique o fato de biópsias realizadas no momento da colocação dos implantes em maxila e mandíbula revelarem tecido ósseo neoformado com ausência de material residual<sup>9,10,11,60</sup>. A osseointegração relatada em alguns casos também é um forte indício de integridade óssea. Caso contrário, a perda de implantes seria maior do que a relatada<sup>9-11,48,59-61</sup>.

Nos grupos de aloenxertos e coágulos sanguíneos irradiados com laser aos 35 dias, observou-se um menor infiltrado inflamatório que no grupo controle. Nos demais grupos, quando comparados com aquele de laserterapia com o seu respectivo grupo controle, não ocorreram diferenças significativas.

Os experimentos em animais são métodos usados para estimar a reação tecidual de materiais bioativos. Os resultados obtidos com um modelo animal experimental não devem necessariamente ser extrapolados para os humanos<sup>74</sup>.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram quantitativa e qualitativamente que o osso alógeno é uma ótima alternativa para realização de enxertos ósseos, concordando com o estudo de Oliveira (2011)<sup>51</sup>, que conclui que o osso alógeno congelado é um biomaterial potencialmente excelente para o tratamento de defeitos ósseos na maxila e mandibular.



*Conclusões*

---

## 6 CONCLUSÕES

Observou-se, na análise histológica através de MO e por MEV, um efeito positivo qualitativo da LLLT, acelerando o processo de osteogênese, incorporação e remodelação, em todos os grupos de aloenxertos e autoenxertos ósseos triturados.

Quantitativamente, a LLLT no grupo de aloenxerto ósseo triturado de 70 dias, apresentou melhores remodelação óssea e vascularização, quando comparou-se com o grupo não irradiado.

Os aloenxertos ósseos triturados demonstraram ser um substituto adequado para os autoenxertos, pois, mesmo com incorporação e remodelação mais lentas, apresentaram viabilidade celular parcial e boa incorporação na interface com o hospedeiro no breve período desta análise.



## *Referências*

---

## REFERÊNCIAS

- 1 Pinheiro AL, Gerbi MEMM. Laserterapia: uma visão atual sobre as aplicações clínicas na prática implantodôntica. In: Querido MRM, Fan YL. Implantes osseointegrados: inovando soluções. São Paulo: Artes Médicas; 2004.
- 2 Gerbi MEMM. Efeitos da radiação laser de 830nm no reparo ósseo de feridas cirúrgicas com implante de osso organico bovino associadas ou não ao uso de membrana [dissertação]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2001.
- 3 Francischone CE. et al. Osseointegração e o tratamento multidisciplinar. São Paulo: Quintessence; 2006.
- 4 Weber JB, Pinheiro AL, Oliveira MG, Oliveira FA, Ramalho LM. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. *Photomed Laser Surg.* 2006 Feb;24(1):38-44.
- 5 De Long WG Jr, 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.* 2007 Mar;89(3):649-58. Review.
- 6 Morelli T, Neiva R, Wang HL. Human histology of allogeneic block grafts for alveolar ridge augmentation: case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2009 Dec;29(6):649-56. Review.
- 7 Bostrom MP, Seigerman DA. The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study. *HSS J.* 2005 Sep;1(1):9-18.
- 8 Baptista AD, Sorrilha A, Tormes TAM, Abdoune YA, Croci AT, Camargo OP et al. Estudo histológico dos enxertos ósseos homólogos humanos. *Acta Ortop Bras.* 2003 Out./Dez.; 11(4) 220-224.
- 9 Leonetti JA, Koup R. Localized maxillary ridge augmentation with a block allograft for dental implant placement: case reports. *Implant Dent.* 2003;12(3):217-26.
- 10 Petrungaro PS, Amar S. Localized ridge augmentation with allogenic block grafts prior to implant placement: case reports and histologic evaluations. *Implant Dent.* 2005 Jun;14(2):139-48.

- 11 Keith JD Jr, Petrungaro P, Leonetti JA, Elwell CW, Zeren KJ, Caputo C, Nikitakis NG, Schöpf C, Warner MM. 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.
- 12 Camarini ET, Leite PCC, Bachega K, Accetturi E. Tecido ósseo alogênico na reconstrução dos maxilares: uma alternativa viável. *J Bras Transpl*. 2007 Jan./Mar.; 10(1):688-691.
- 13 Valiati R. Análise do efeito da laserterapia na incorporação de aloenxertos ósseos em blocos processados por congelamento profundo: estudo em coelhos [tese]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2011.
- 14 Brand RA. 50 years ago in CORR: physiologic basis of bone-graft surgery Marshall R. Urist MD *CORR* 1953;1:207-216. *Clin Orthop Relat Res*. 2008 Aug;466(8):2015-6.
- 15 Misch CE. Implantes dentários contemporâneos. 2ª ed. São Paulo: Santos; 2006.
- 16 Levandowski N Jr, Pfeifer AB, Paza AO, Valiati R, Silva MRPB. Utilização do osso alógeno em bloco para aumento de rebordo alveolar: revisão da literatura. *ImplantNews*. 2008 Jan./Fev.;5(1):51-7
- 17 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*. 1987 Sep;64(3):269-74.
- 18 Matte EW. Enxerto de sínfise mandibular para recuperação de rebordos reabsorvidos e colocação de implantes osseointegrados [dissertacao]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2000.
- 19 Bezerra FJB, Lenharo A. Terapia clínica avançada em implantodontia. São Paulo: Artes Médicas, 2002.
- 20 Betz RR. Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. *Orthopedics*. 2002 May;25(5 Suppl):s561-70. Review.
- 21 Lewandowski KU, Rebmann V, Pässler M, Schollmeier G, Ekkernkamp A, Grosse-Wilde H, Tomford WW. Immune response to perforated and partially demineralized bone allografts. *J Orthop Sci*. 2001;6(6):545-55.
- 22 Kahnberg K-E. Enxertos ósseos para implantes na maxila. Porto Alegre: Artmed; 2006.

23 Misch CE. Implantes dentais contemporâneos: considerações fundamentais sobre enxerto ósseo e materiais para enxerto ósseo. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 839-69.

24 Palomo JM, Rao PS, Hans MG. Influence of CBCT exposure conditions on radiation dose. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Jun;105(6):773-82. Epub 2008 Apr 18.

25 Delloye C, Cnockaert N, Cornu O. Bone substitutes in 2003: an overview. *Acta Orthop Belg.* 2003;69(1):1-8. Review.

26 Truumees E, Hercowitz HN. Alternatives to autologous bone harvest in spine surgery. *University of Pennsylvania Orthop J.* 1999;12:77-88.

27 Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res.* 2000 Feb;(371):10-27. Review.

28 Nather A. Biology of healing of large deep-frozen cortical bone allografts. In: Phillips GO, editor. *Bone biology and healing: an advances in tissue banking specialist publication.* Singapore: World Scientific Publishing; 2003. p. 47-67.

29 Peleg M, Sawatari Y, Marx RN, Santoro J, Cohen J, Bejarano P, Malinin T. Use of corticocancellous allogeneic bone blocks for augmentation of alveolar bone defects. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010 Jan-Feb;25(1):153-62.

30 Galea G, Kearney JN. Clinical effectiveness of processed and unprocessed bone. *Transfus Med.* 2005 Jun;15(3):165-74. Review.

31 Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002 Mar;84-A(3):454-64. Review.

32 Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S, Limlertmongkol S. Osteoconductive effects of 3 heat-treated hydroxyapatites in rabbit calvarial defects. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Dec;65(12):2418-24.

33 Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res.* 1987 Dec;(225):7-16.

34 Burchardt H, Jones H, Glowczewskie F, Rudner C, Enneking WF. Freeze-dried allogeneic segmental cortical-bone grafts in dogs. *J Bone Joint Surg Am.* 1978 Dec;60(8):1082-90.

- 35 Zipfel GJ, Guiot BH, Fessler RG. Bone grafting. *Neurosurg Focus*. 2003 Feb;14(2):e8. Review.
- 36 Pontual MAB, Magini RS. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento. São Paulo: Santos; 2004.
- 37 Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg*. 2006 Apr;24(2):169-78. Review.
- 38 Arrotéia KF, Pereira LAVD. O osteoblasto. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB. *Células: uma abordagem multidisciplinar*. São Paulo: Manole; 2005. p. 34-49.
- 39 Aspenberg P. Bone replacement studies using titanium chamber models in small animals. In: Czitrom AA, Winkler H, editors. *Orthopaedic Allograft Surgery*. New York: Springer Wien, 1996. p. 53-60.
- 40 Malinin T, Temple HT. Comparison of frozen and freeze-dried particulate bone allografts. *Cryobiology*. 2007 Oct;55(2):167-70. Epub 2007 Jun 15.
- 41 Bauer TW. An overview of the histology of skeletal substitute materials. *Arch Pathol Lab Med*. 2007 Feb;131(2):217-24. Review.
- 42 Burchardt H. Current concepts in bone grafting. In: Czitrom AA, Winkler H, editors. *Orthopaedic allograft surgery*. New York: Springer Wien, 1996. p. 3-10.
- 43 Vaccaro AR. The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. *Orthopedics*. 2002 May;25(5 Suppl):s571-8. Erratum in: *Orthopedics* 2002 Nov;25(11):1224.
- 44 Barone A, Varanini P, Orlando B, Tonelli P, Covani U. Deep-frozen allogeneic onlay bone grafts for reconstruction of atrophic maxillary alveolar ridges: a preliminary study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Jun;67(6):1300-6.
- 45 Contar CM, Sarot JR, Bordini J Jr, Galvão GH, Nicolau GV, Machado MA. Maxillary ridge augmentation with fresh-frozen bone allografts. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Jun;67(6):1280-5.
- 46 Tomford WW. Bone allografts: past, present and future. *Cell Tissue Bank*. 2000;1(2):105-9.
- 47 Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN; American Academy of Orthopaedic Surgeons. The Committee on Biological Implants. Bone-graft

substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A(Suppl 2 Pt 2):98-103.

48 Keith JD Jr. Localized ridge augmentation with a block allograft followed by secondary implant placement: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2004 Feb;24(1):11-7.

49 Spin-Neto R, Landazuri Del Barrio RA, Pereira LAV, Marcantonio RA, Marcantonio E, Marcantonio E Jr. Clinical similarities and histological diversity comparing fresh frozen onlay bone blocks allografts and autografts in human maxillary reconstruction. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2011 Aug 11. [Epub ahead of print]

50 Hofmann A, Konrad L, Hessmann MH, Kühle R, Korner J, Rompe JD, Rommens PM. The influence of bone allograft processing on osteoblast attachment and function. *J Orthop Res*. 2005 Jul;23(4):846-54. Epub 2005 Jan 26.

51 Oliveira JC. Alterações clínicas e imaginológicas dos enxertos alógenos na reconstrução do defeito ósseo classe I de Seibert em maxila anterior [dissertação]. Belo Horizonte: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais; 2011.

52 DePaula CA, Truncate KG, Gertzman AA, Sunwoo MH, Dunn MG. Effects of hydrogen peroxide cleaning procedures on bone graft osteoinductivity and mechanical properties. *Cell Tissue Bank*. 2005;6(4):287-98.

53 Aslan M, Simsek G, Dayi E. The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. *J Biomater Appl*. 2006 Jan;20(3):209-20.

54 Andrade MG, Sá CN, Marchionni AM, Bittencourt TCSC, Sadigursky M. Effects of freezing on bone histological morphology. *Cell Tissue Bank*. 2008 Dec;9(4):279-87. Epub 2008 Mar 5.

55 Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Nº 1686/GM em 20 de setembro de 2002. Brasília, 2002. [citado 2011 jun 22]. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2002/prt1686\\_20\\_09\\_2002.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2002/prt1686_20_09_2002.html)

56 Miron RJ, Hedbom E, Saulacic N, Zhang Y, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D. Osteogenic potential of autogenous bone grafts harvested with four different surgical techniques. *J Dent Res*. 2011 Dec;90(12):1428-33. Epub 2011 Sep 21.

57 Zide MF. Autogenous bone harvest and bone compacting for dental implants. *Compend Contin Educ Dent*. 2000 Jul;21(7):585-90; quiz 592.

58 Pallesen L, Schou S, Aaboe M, Hjørting-Hansen E, Nattestad A, Melsen F. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002 Jul-Aug;17(4):498-506.

59 Perrott 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.

60 Köndell PA, Mattsson T, Astrand P. Immunological responses to maxillary on-lay allogeneic bone grafts. *Clin Oral Implants Res*. 1996 Dec;7(4):373-7.

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

62 Accetturi E, Ermani KB, Goldoni PR, Esteves SRR, Accetturi F, Cavalca D. Reconstrução de defeitos ósseos na maxila e mandíbula com osso humano congelado. *Rev. Cienc. Odontol*. 2000 Jan./Dez.;3(3):27-30.

63 Lyford RH, Mills MP, Knapp CI, Scheyer ET, Mellonig JT. Clinical evaluation of freeze-dried block allografts for alveolar ridge augmentation: a case series. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003 Oct;23(5):417-25.

64 Zadeh HH. Implant site development: clinical realities of today and the prospects of tissue engineering. *J Calif Dent Assoc*. 2004 Dec;32(12):1011-20. Review.

65 Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Oct;17 (Suppl 2):136-59. Review.

66 Wallace S, Gellin R. Clinical evaluation of freeze-dried cancellous block allografts for ridge augmentation and implant placement in the maxilla. *Implant Dent*. 2010 Aug;19(4):272-9.

67 Spin-Neto R, Pereira LAV, Marcantonio E, Marcantonio RAC, Marcantonio E Jr. Incorporação de enxertos ósseos autógenos e homogêneos em humanos: abordagem tomográfica. *ImplantNews*. 2010;7(3a-PBA):105-12.

68 Lievens PC. The effect of I.R. laser irradiation on the vasomotricity of the lymphatic system. *Lasers Med Sci*. 1991;6(2):189-91.

69 Gutknecht N, Eduardo CP. A odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica. São Paulo: Quintessence; 2003.

70 Brugnera A Jr et al., colaboradores. Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica. São Paulo: Santos, 2003.

71 Lopes LA. Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência [dissertação]. São José dos Campos, SP: Universidade do Vale do Paraíba; 1999.

72 Carvalho DCL, Rosimb GC, Gama LOR, Tavares MR, Tribioli RA, Santos IR, et al. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. Rev Saúde Pública. 2002, 36(5):647-54.

73 Silva AN Jr, Pinheiro AL, Oliveira MG, Weismann R, Ramalho LM, Nicolau RA. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. J Clin Laser Med Surg. 2002 Apr;20(2):83-7.

74 Khadra M, Ronold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haanaes HR. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. Clin Oral Implants Res. 2004 Jun;15(3):325-32.

75 Karu TI. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. IEEE J Quantum Electron. 1987 Oct.;23(10):1703-17.

76 Karu TI, 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. Select. Topics Quantum Electron. 2001 Nov/Dec;7(6): 976-81.

77 Aquino RLS. Efeito do uso do laser de baixa potência no tratamento das disfunções têmporo-mandibulares e dor orofacial: um ensaio clínico randomizado [dissertação]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2006.

78 Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1997 May;111(5):525-32.

79 Jakse N, Payer M, Tangl S, Berghold A, Kirmeier R, Lorenzoni M. Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation. An experimental study on sheep. Clin Oral Implants Res. 2007 Aug;18(4):517-24. Epub 2007 Apr 19.

80 Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica*. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

81 Brugnera A Jr. Laser phototherapy in dentistry. *Photomed Laser Surg*. 2009 Aug;27(4):533-4.

82 Merli LA, Santos MT, Genovese WJ, Faloppa F. Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. *Photomed Laser Surg*. 2005 Apr;23(2):212-5.

83 Pinheiro AL, Gerbi MEMM, Limeira FA Jr, Carneiro Ponzi EA, Marques AM, Carvalho CM, Carneiro Santos R, Oliveira PC, Nóia M, Ramalho LM. Bone repair following bone grafting hydroxyapatite guided bone regeneration and infra-red laser photobiomodulation: a histological study in a rodent model. *Lasers Med Sci*. 2009 Mar;24(2):234-40. Epub 2008 Apr 17.

84 Dörtbudak O, Haas R, Mallath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res*. 2000 Dec;11(6):540-5.

85 Obradovic RR, Kesic LG, Pesevska S. Influence of low-level laser therapy on biomaterial osseointegration: a mini-review. *Lasers Med Sci*. 2009 May;24(3):447-51. Epub 2008 Jun 20. Review.

86 Dörtbudak O, Haas R, Mailath-Pokorny G. Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. *Clin Oral Implants Res*. 2002 Jun;13(3):288-92.

87 Nicola RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MT, Reis LM, Zângaro RA. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci*. 2003;18(2):89-94.

88 Pinheiro AL, Limeira FA Jr, Gerbi ME, Ramalho LM, Marzola C, Ponzi EA. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. *Braz Dent J*. 2003;14(3):177-81. Epub 2004 Mar 29.

89 Gerbi MEMM, Pinheiro AL, Marzola C, Limeira Jr FA, Ramalho LM, Ponzi EA, Soares AO, Carvalho LC, Lima HV, Gonçalves TO. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830 nm. *Photomed Laser Surg*. 2005 Aug;23(4):382-8.

90 Lopes CB, Pinheiro AL, Sathaiiah S, Duarte J, Cristinamartins M. Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a Raman spectroscopic study. *Photomed Laser Surg*. 2005 Feb;23(1):27-31.

91 Lopes CB, Pinheiro AL, Sathaiyah S, Da Silva NS, Salgado MA. Infrared laser photobiomodulation ( $\lambda$  830 nm) on bone tissue around dental implants: a Raman spectroscopy and scanning electronic microscopy study in rabbits. *Photomed Laser Surg.* 2007 Apr;25(2):96-101.

92 Guimarães KB. Fotoengenharia do processo de reparo ósseo induzido pela laserterapia de baixa potencia (AsGaAl): estudo em fêmures de ratos [tese]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2006.

93 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.* 2007 Mar-Apr;22(2):92-7.

94 Torres CS, Santos JN, Monteiro JS, Amorim PG, Pinheiro AL. 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. *Photomed Laser Surg.* 2008 Aug;26(4):371-7.

95 AboElsaad NS, Soory M, Gadalla LM, Ragab LI, Dunne S, Zalata KR, Louca C. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study). *Lasers Med Sci.* 2009 May;24(3):387-95. Epub 2008 Jun 26.

96 Campanha BP, Gallina C, Geremia T, Loro RC, Valiati R, Hübler R, de Oliveira MG. Low-level laser therapy for implants without initial stability. *Photomed Laser Surg.* 2010 Jun;28(3):365-9.

97 Brasil. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. *Diário Oficial da União - Seção 1, Brasília, 09 out. 2008.* [citado 2011 abr 20]. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm)

98 Reis FA, Belchior ACG, Nicolau RA, Fonseca TS, Carvalho PTC. Efeito da terapia com laser de arsenieto de gálio e alumínio (660Nm) sobre a recuperação do nervo ciático de ratos após lesão por neurotmesa seguida de anastomose epineural: análise funcional. *Rev Bras Fisioter.* 2008 Maio/Jun;12(3):215-21.

99 Rocha AM Jr, Vieira BJ, De Andrade LC, Aarestrup FM. Low-level laser therapy increases transforming growth factor-beta2 expression and induces apoptosis of epithelial cells during the tissue repair process. *Photomed Laser Surg.* 2009 Apr;27(2):303-7.

100 Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral: texto, atlas, correlações clínicas.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

101 Haas R, Haidvogel D, Donath K, Watzek G. Freeze-dried homogeneous and heterogeneous bone for sinus augmentation in sheep. Part I: histological findings. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Aug;13(4):396-404.

102 Norman-Taylor FH, Villar RN. Bone allograft: a cause for concern? *J Bone Joint Surg Br.* 1997 Mar;79(2):178-80. Review.

103 Wallace SS, Froum SJ. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003 Dec;8(1):328-43. Review.

104 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.* 2004 Jun;22(3):249-53.

105 Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2005 Apr;23(2):161-6.

106 Bruno Pereira Campanha, Clóvis Gallina, Tomás Geremia, Raphael Carlos Drumond Loro, Renato Valiati, Roberto Hübner, Marília Gerhardt de Oliveira. *Photomedicine and Laser Surgery.* June 2010, 28(3): 365-369. doi:10.1089/pho.2008.2429.



*Anexos*

---

**ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA  
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (UDESC)**



Ofício n° 06/10 – CETEA/CAV

Lages, 14 de junho de 2010.

Prezada Professor .

O Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, reunido no dia 14/06/2010, aprovou a mudança do título do projeto de pesquisa de protocolo n° **1.13.08 bem como do orientador do referido projeto**. Origem: Doutorado em Odontologia da PUC/RS. Interessado: Profa.Dra. Marilia Gerhardt de Oliveira. Título: **“Efeitos do laser de baixa potência na incorporação de aloenxerto ósseo triturado”**. O referido projeto já foi aprovado na reunião de 30/05/2008 , ficando com o mesmo número de protocolo. Sem mais para o momento, agradecemos.

Atenciosamente,

*Ass*  
**Aury Nunes de Moraes**  
Presidente do CETEA  
CAV/UDESC  
4244-0542

**Ilmo. Profa . Dra.**  
**Marilia Gerhardt de Oliveira**  
**CAV/UDESC**

**ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO PARA EXECUÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA (UDESC)**



Universidade do Estado de Santa Catarina  
CAV - LAGES

CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV

Ilma. Sra.  
PROF<sup>a</sup> Dra. MARÍLIA GERHARDT DE OLIVEIRA  
Av. Ipiranga, 6681 / PUCRS / Pós-graduação  
Partenon  
90619-900 - Porto Alegre, RS

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “*Efeitos do laser de baixa potência na incorporação de aloenxerto ósseo triturado*”, foi aprovado nas instâncias regimentais do Centro de Ciências Agroveterinárias (Departamento, Comissão de Pesquisa, Conselho de Centro e Comitê de Ética em Experimentação Animal) e possui autorização da Instituição para sua execução.

Lages/SC, 10 de junho de 2010.

**PROF. CRISTIANO ANDRÉ STEFFENS**  
Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação  
CAV/UDESC

**ANEXO C – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA  
DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PUCRS**



*Comissão Científica e de Ética  
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

**Porto Alegre 06 de agosto de 2009**

**O Projeto de: Tese**

**Protocolado sob nº:** 0032/09  
**Intitulado:** Efeitos do laser de baixa potência na incorporação de aloenxerto ósseo triturado  
**Pesquisador Responsável:** Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira  
**Pesquisadores Associados** Jefferson Viapiana Paes  
**Nível:** Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 05 de agosto de 2009.

*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 D - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS (PUCRS)



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

Ofício 133/10 – CEUA

Porto Alegre, 05 de agosto de 2010.

Senhora Pesquisadora:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 09/00137, intitulado: **"Efeitos do laser de baixa potência na incorporação de Aloenxerto ósseo triturado"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

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

Ilma. Sra.  
Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira  
Faculdade de Odontologia  
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](mailto:ceua@pucrs.br)