



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO COMPARATIVO EM ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO EM TÍBIA DE COELHO,
REALIZADO COM LASER DE Er,Cr: YSGG OU COM BROCAS 701.**

SILVIO MAURO GALLON

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Mestre Profissional na área
de *Lasers* na Odontologia

Orientadora:
PROFa. Dra. Denise Maria Zezell

Co-Orientadora:
PROFa. Dra. Sheila Cynthia Gouw-Soares

**São Paulo - SP
2006**



DEDICATÓRIA

Acredito que em nossos projetos nenhuma caminhada é possível de ser feita só.

Estamos constantemente nos apoiando uns nos ombros dos outros para subirmos cada degrau da escada de nossas vidas.

Dedico esse trabalho, o tempo e o esforço que ele representa àqueles que foram a sustentação dos meus degraus durante esse curso. Possibilitaram a minha subida com a firmeza do concreto e a beleza do mármore sempre compreendendo sobre os momentos que estive ausente, que estive distante em pensamento ou que minha presença pedia que deixassem de suas coisas para ajudar-me a cuidar das minhas.

A você Iara minha amada e companheira, obrigado pelo incentivo e pelo amor que tanto me fazem sentir feliz e me devolvem o equilíbrio nos momentos em que as dificuldades surgem;

Aos meus pais Rosa e Lucindo e minha irmã Andréa, pelo amor e pelos valores que me ensinaram responsáveis por abrirem as portas por onde tenho passado, facilitando minha caminhada;

A extensão da minha família: Ari, Julia, Leandra, Fernanda e Rebeca, pelo respeito e carinho que dedicam a mim e pela alegria que me proporcionam.

Silvio Mauro Gallon

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a(os):

- Equipe de funcionários do LELO e do IPEN pela acolhida, carinho e presteza;
- Professores, pelos ensinamentos científicos, direcionamento profissional e respeito;
- Colegas de curso, pelos excelentes momentos de convivência, aprendizado mútuo e relações de amizade que se estabeleceram a partir de um objetivo comum. Especialmente a colega e amiga Eleni Cristina Kairalla e sua família, pelo carinho e atenção dedicados em todos os momentos;
- Meu colega e mais novo irmão Mauro Cristiano Caetano Rossi, pelos laços de amizade criados pela convivência e pela confiança que nortearam momentos de trabalho intenso e irreverência, sempre considerando o objetivo maior de lograr êxito em nossa caminhada, uai!;
- Os técnicos Vicente de Paula Silveira e Claudinor Donizette Vidotti pelo empenho e disponibilidade com que nos auxiliaram na manipulação e cuidados dos animais utilizados no experimento;
- Dr. Eduardo Pompeu pela disponibilização imediata dos animais e da estrutura necessária ao cuidado dos mesmos durante o estudo, auxiliando-nos com informações precisas indispensáveis ao manejo dos animais;
- Dras. Suzana C. Orsini Machado de Souza e Marina Helena C. G. Magalhães por todo o apoio prestado viabilizando os laboratórios e equipamentos e auxiliando na interpretação das lâminas histológicas, amparando-nos na condução da fase final do trabalho;
- A dedicada Patrícia Aparecida da Ana, em função de todos os auxílios prestados no laboratório de Biofotônica do CLA;
- A Ms. Márcia Sampaio e a Sra. Elisa dos Santos pelo apoio e dedicação na durante a histologia;
- Celso Vieira de Moraes, pela paciência e acompanhamento durante os procedimentos de análise sob Microspia Eletrônica de Varredura;

- Prof. Dra. Sheila CYNthia Gouw-Soares, por toda a compreensão, disposição e disponibilidade em auxiliar e ensinar durante todo andamento do curso tornando-se uma querida amiga e também minha referência profissional no conhecimento e utilização dos *laseres* na odontologia;
- De forma muito especial a minha Incansável Orientadora, que apesar das inúmeras responsabilidades sempre esteve pronta, com carinho e vontade para orientar-me no que foi preciso, mesmo quando, por vezes não tivesse sido respondida à altura de sua dedicação. Assim como à professora Sheila, lhe tenho por exemplo de profissional e de indivíduo, e tomara que possa conduzir meus alunos com a maestria que fui conduzido durante o desenvolvimento dessa pesquisa;
- A Deus, por mais uma vez ter semeado em meu caminho todas essas pessoas que de forma decisiva contribuíram para meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

“ Cada um de nós representa a soma das pessoas com quem convive ao longo da vida, assimilando um pouco de cada uma à cada encontro e polinizando um pouco de si, num contínuo aprendizado, ganhando sabedoria e serenidade cada vez que se depara com alguém como vocês”.

Muito obrigado;

Silvio Mauro Gallon

RESUMO

Esta pesquisa teve por objetivo analisar comparativamente a interface de união, compreendida entre um bloco ósseo autógeno para enxerto e uma área receptora, utilizando, para o estudo a técnica efetuada com *laser* de Er,Cr:YSGG, e como controle a técnica convencional com Brocas 701, instaladas em motor rotatório.

Para o experimento foram utilizados 09 coelhos, New Zealand, fêmeas adultas.

Os animais foram anestesiados, operados de acordo com o seu grupo, sacrificados seriadamente e cortes ósseos da região do enxerto foram preparados e analisados sob microscopia eletrônica de varredura e histologia por microscopia óptica, visando uma comparação qualitativa entre os métodos cirúrgicos estudados.

Na fase final do período de reparação estudado (45 dias), não houve diferença qualitativa entre a cicatrização da interface osso/enxerto, quando comparada as condições *laser* Er,Cr:YSGG e brocas, indicando que o *laser* ErCr:YSGG é um potencial candidato para a realização de enxertos autógenos *in vivo*;

Palavras chave: Enxerto Ósseo Autógeno, Er,Cr: YSGG, Reparo ósseo; Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia Óptica, *Laser*.

ABSTRACT

This research had as objective to analyze the interface of union comparatively, consisted between a block of autogenous bone for grafting and a receiving area, using, for the study the achieved technique with *laser* of Er, Cr: YSGG, and as control the conventional technique with Drills 701, installed in rotatory engine.

For the experiment, nine adult female New Zealand rabbits were used.

The animals were anestesiased, the procedures were achievement according each group, then they were sacrificed and the bone slices of the grafts zone were prepared and analyzed under scanning electronic microscopy (SEM), and histological evaluation, aiming at a qualitative comparison between the studied surgical methods.

At the end of the repair period this study (45 days), don't have qualitative difference between the bone/graft interface healing, when compared the Er,Cr:YSGG *laser* and drills condition, showing that the Er,Cr:YSGG *laser* is a potential candidate to the achievement *in vivo* bone grafts.

Key words: Autogenous bone grafts, Er, Cr: YSGG, Bone Repair; Scanning Electronic Microscopy, Bone Histology, Microscopy, *Laser*.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Aloenxertos	8
1.2. Xenoenxertos.....	10
1.3. Enxertos Autógenos.....	10
1.4 Enxertos Intrabuciais.....	14
1.4.1. Obtenção do Enxerto.....	15
1.4.2. Preparo da Área Receptora.....	16
1.5. <i>Laser</i> na Ablação e Corte de Tecido Ósseo	17
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Seleção das Amostras.....	22
3.2. Protocolo de Anestesia e Medicação.....	27
3.3. Técnicas Cirúrgicas.....	27
3.4. Preparação para Microscopia Eletrônica de Varredura.....	34
3.5. Preparação para Histologia sob Microscopia de Luz.....	36
3.6 Avaliações.....	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Microscopia Eletrônica de Varredura	38
4.2. Microscopia de Luz	49
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

INTRODUÇÃO

A reabilitação dos dentes perdidos é preocupação milenar e com o advento da implantodontia atual essa tornou-se uma opção concreta e viável. Entretanto, em inúmeros casos a simples substituição do elemento dental perdido por um implante metálico não é tarefa tão simples assim. É comum não haver estrutura óssea de suporte suficiente à adaptação do implante. As dimensões inadequadas podem ser divididas em altura ou espessura insuficientes, sendo que a deficiência de espessura é a mais comumente encontrada. Para esses casos, uma série de alternativas são propostas na literatura, desde enxertos alógenos, xenógenos e autógenos. Dentre todas essas alternativas, os enxertos autógenos são os mais biocompatíveis e com resultados mais próximos do ideal. Os enxertos autógenos, obtidos a partir do próprio paciente, são considerados vitais, os demais, aloenxertos e xenoenxertos, não²².

1. 1. Aloenxertos:

Uma fonte alógena ou substituta para o osso autógeno surgiu da necessidade de suprir o próprio material do paciente e se evitar a necessidade de abordar um segundo local cirúrgico, como sítio doador. Assim temos esse grupo de enxertos derivados de cadáveres, que ficam disponíveis em bancos de tecidos.

Os aloenxertos dividem-se em duas formas: FDBA (aloenxerto ósseo seco-congelado, mineralizado (liofilizado), e DFDBA (aloenxerto ósseo seco-congelado desmineralizado)¹⁸.

Devido a sua mineralização, o FDBA mineraliza muito mais rápido que o DFDBA. Experiências clínicas têm demonstrado que os enxertos em que foram utilizados DFDBA resultaram em material cartilaginoso após seis meses, enquanto o FDBA apresentou um material duro, bastante semelhante ao osso. Há várias situações clínicas em que o FDBA foi mais efetivo que o DFDBA, como por exemplo em fenestrações, pequeno aumento de rebordo, alvéolos frescos, levantamento de seio maxilar, deiscência e exposição de implantes. Um enxerto que seja semelhante ao osso ou o próprio osso é essencial quando se trata de defeitos ósseos presentes em implantes ou para implantes ^{18,22}.

As principais vantagens do uso de aloenxertos incluem o fato de já estarem prontos para a enxertia, eliminando a necessidade de um sítio doador, ou seja, uma segunda área cirúrgica, o que reduz a anestesia, o tempo cirúrgico e possibilita menor perda sanguínea, apresentando menos complicações. E, a respeito das desvantagens, estão associadas com o fato de se usar tecido de outro indivíduo, a qualidade do enxerto ósseo, e subsequentemente, a saúde óssea do mesmo, que está diretamente relacionada com a história médica do doador. Na literatura há controvérsias que provêm a inatividade do vírus HIV, mesmo sendo esse tipo de enxerto seco e congelado. E, por serem removidos de

cadáveres, podem provocar algum tipo de rejeição, como acontece com transplantes de órgãos¹⁸.

1.2 Xenoenxertos:

Não são muito utilizados, devido as suas propriedades imunológicas, por serem provenientes de espécies diferentes. Atualmente, uma das grandes desvantagens desses enxertos é a possibilidade de transmissão de doenças (vaca-louca, febre aftosa e outras). Como são materiais normalmente de origem bovina, são tratados quimicamente para fornecer um enxerto aceitável para a enxertia em humanos. Um exemplo desse tipo de enxerto é o BIO-OSS, um enxerto anorgânico, osteoindutor; poroso, biocompatível e estéril²².

Utilizado nas cirurgias orais, o BIO-OSS é processado pela remoção total do componente orgânico do osso bovino. Devido à sua estrutura natural, é física e quimicamente comparável à matriz óssea mineralizada humana. Está disponível em granulação, em blocos medulares ou corticais. É muito utilizado em combinação com o osso autógeno em levantamento de seio maxilar²².

1.3 Enxertos Autógenos:

É notório que o melhor material para enxertia é aquele derivado do próprio paciente, devido às suas propriedades biológicas e à ausência de rejeição

orgânica^{1,15,18}. Há um consenso de que os enxertos ósseos autógenos são claramente a melhor e mais desejável maneira para reparar o tecido ósseo perdido ou deficientemente formado, apesar da morbidade associada à área doadora. As suas principais características são¹:

1. A resposta imune pode ser desconsiderada, devido ao reconhecimento pela área receptora como própria, e a incompatibilidade antigênica é evitada;
2. Os enxertos ósseos autógenos frescos carregam com eles uma variedade de elementos celulares e humorais que sobrevivem ao trauma cirúrgico, iniciando e acelerando o processo de integração ao leito receptor.
3. O enxerto deriva do próprio indivíduo, o que elimina as incertezas quanto à fonte doadora, fabricação, estocagem e controle de qualidade. A possibilidade de infecção é menor, e a reparação tecidual será mais rápida; não existe o risco de transmissão de enfermidades e, por fim, não há custo adicional, e ele é de certa forma de fácil obtenção.

No entanto, apresenta algumas diferenças em relação à área doadora, tipo de osso e origem embrionária.

O osso autógeno é o único material com propriedades osteogênicas, no qual se processa o crescimento ósseo a partir de células viáveis, como os osteoblastos, e pelas células que se originam dentro da medula. Apresentam-se

na forma particulada ou em bloco, dependendo da técnica de obtenção e da necessidade requerida¹⁸.

Uma vez separados da área doadora, sem qualquer pedículo vascular aderido, são denominados enxertos livres, e dependem totalmente do leito receptor para a sua nutrição; no entanto, perdem muito da sua vitalidade celular durante a técnica de retirada e transferência, mas fornecem um arcabouço estrutural imunologicamente inerte, que é rapidamente vascularizado e incorporado ao leito receptor, promovendo a osteogênese^{18,22}.

Os enxertos autógenos podem ser obtidos de vários sítios doadores, sempre do mesmo paciente que necessita do tratamento. Alguns sítios situam-se fora da cavidade oral, e podem ser encontrados no osso ilíaco, ossos do crânio, costelas e fíbula. Entretanto os enxertos de maior compatibilidade estrutural são obtidos nos ossos formadores da cavidade oral, e podem ser extraídos do ramo ascendente da mandíbula, mento e tuberosidade maxilar^{1,22}.

Os enxertos ósseos extraídos da mandíbula, seja mento ou ramo ascendente, têm sido preferencialmente utilizados por serem classificados de melhor qualidade, quanto a densidade e estrutura trabecular. O osso obtido da túber maxilar, apresenta uma característica esponjosa de grandes lojas, ou seja, seu trabeculado, além de mais delgado, preserva mais espaços em seu interior, o que confere uma estrutura menos mineralizada^{1,10}.

Nas técnicas de enxerto ósseo em espessura, é preciso prover incremento da dimensão vestibulo – lingual/palatina, do rebordo atrófico. Para tal êxito,

procede-se iniciando com a extração de um bloco ósseo da área doadora e posterior fixação do bloco na área receptora. É imprescindível para o sucesso do enxerto, que não haja micromovimento do fragmento ósseo enxertado e para que isso seja obtido, o mesmo é fixado por um parafuso de titânio transfixante.

A estrutura do tecido ósseo com sua dinâmica celular de síntese e absorção, através dos osteoblastos e osteoclastos, da mesma maneira que permite a renovação óssea ao longo da vida, também é responsável por permitir a união de porções ósseas descontinuadas, seja por fraturas ou objetivos cirúrgicos, viabilizando o desenvolvimento dos procedimentos de enxerto ósseo¹⁰.

O enxerto, após decorrido o período de cicatrização (4 a 6 meses), passa a compor um monobloco com a área receptora, e então está apto a receber o implante osseointegrado^{1,18,22}.

Alguns aspectos devem ser observados para consolidar o sucesso do enxerto. Boa integração entre o fragmento enxertado e a área receptora, mínima reabsorção do bloco enxertado e aspecto visual de osso viável, são características importantes de serem verificadas e associadas ou não ao êxito do enxerto. Para que essas características sejam obtidas, uma técnica cirúrgica adequada é fundamental e é nesse ponto em que firmamos o objetivo de nosso estudo.

A seleção da área doadora apropriada deverá levar em consideração a finalidade para a qual o enxerto se destina e ponderar o estado geral de saúde do paciente e a relação biológica entre o custo e o benefício da técnica.

Muitas áreas extra-orais podem ser doadoras, como crista do osso ilíaco, calota craniana, fíbula, tíbia, arco costal, e outros, mas é na região intrabucal que se concentram a maioria das retiradas ósseas com finalidade de enxertos orais, ficando limitadas apenas a quantidade óssea necessária, mas com a melhor indicação de qualidade¹.

1.4 Enxertos intrabucais

A sua grande vantagem está em apresentar um único campo cirúrgico, o que diminui o tempo de anestesia, o custo, a morbidez da coleta do enxerto e as complicações de ordem sistêmica¹.

A eleição da área doadora adequada dependerá da quantidade de volume ósseo necessário, e devemos levar em consideração a maior proximidade da área a ser operada, para melhor conforto do paciente no pós-operatório. As principais áreas intrabucais doadoras referem-se ao mento mandibular e a região de bordo anterior do ramo ascendente.

A higidez dos tecidos de sustentação e revestimento dos sítios doadores e receptores é uma condição importante e indispensável para o sucesso do enxerto ósseo. Fatores locais, como ausência de infecção, formato anatômico, vascularização do leito, espessura e qualidade dos tecidos gengivais e ausências de neoplasias são fundamentais para um bom prognóstico do enxerto¹⁸.

1.4.1 Obtenção do Enxerto:

Os enxertos podem ser obtidos por várias técnicas, de acordo com a necessidade gerada pelo defeito a ser tratado. As áreas preferenciais de obtenção dos enxertos são a sínfise mentoniana, o bordo lateral do ângulo e do ramo ascendente da mandíbula, bilateralmente¹⁸.

Atualmente, podemos lançar mão de raspadores para a remoção de osso particulado, brocas trefinas para a remoção de pequenas porções ósseas e brocas 701, para a tradicional remoção de blocos ósseos de maior volume.

A técnica de retirada de blocos ósseos através de brocas 701, é muito simples e consiste em desenhar, na área doadora escolhida, o formato do enxerto que vai ser removido, cortando-o com a broca na profundidade em que não mais encontremos osso cortical.

O sinal inconfundível de que a profundidade correta foi atingida, é o início de um sangramento profuso, que provém do osso medular sub-cortical. A partir desse ponto, o emprego de elevadores é necessário para deslocar o bloco de enxerto.

O bloco retirado deve ter suas dimensões modeladas de acordo com a área receptora, para que a melhor adaptação possível seja conseguida, afim de reduzir o número de espaços sem contato na interface do enxerto. Espículas ósseas e bordas obtusas, devem ser removidas para facilitar a cobertura dos tecidos moles e evitar pontos de possíveis necroses.

Após a modelagem do bloco, ele deve ser perfurado para receber um parafuso de fixação, que irá mantê-lo em posição durante a cicatrização.

1.4.2 Preparo da área receptora:

A área receptora, ou o defeito ósseo que receberá o enxerto, pode ser classificado de acordo com o rebordo alveolar residual.

Atualmente duas classificações são aceitas:

Classificação de Allen¹⁸:

Tipo A: Defeito em altura óssea;

Tipo B: Defeito em espessura óssea;

Tipo C: Defeito em altura e espessura óssea.

Classificação de Seibert²²:

Classe I: Defeito em altura óssea;

Classe II: Defeito espessura óssea;

Classe III: Defeito em altura e espessura óssea.

Seguindo uma ordem de dificuldade reabilitadora, os defeitos que combinam altura e espessura são os mais complicados de se obter uma solução adequada e os defeitos apenas em espessura, apresentam soluções mais simples.

Independente da classificação do defeito é importante preparar o leito receptor para a otimização da cicatrização. Isso se faz com pequenas perfurações na tábua cortical que irá assentar o enxerto, favorecendo a criação de pontes de coágulo entre o osso medular, mais vascularizado, do leito receptor e superfície do bloco de enxerto. Isso faz com que os osteócitos viáveis, do osso medular acelerem o processo de reparo da interface, que se dá semelhante à uma fratura óssea.

Entre os princípios fundamentais de um enxerto bem sucedido, estão o não aquecimento excessivo do osso extraído, a melhor adaptação possível da interface osso/enxerto, e um tempo cirúrgico coerente, sem atraso excessivo entre a retirada e a fixação do enxerto. Cuidados com a assepsia do campo cirúrgico são fundamentais, pois a contaminação do enxerto determina sua necrose e conseqüentemente sua perda^{1,18,22}.

1.5 *Laser* na Ablação e Corte de Tecido Ósseo

Muitos estudos têm sido propostos com o intuito de evidenciar vantagens no uso de *laser* em osteotomias, sendo que apontam para os *laseres* de Er:YAG e Er,Cr:YSGG, como os mais indicados para procedimentos de ablação óssea^{28,2,19}.

A característica regular e precisa da cavidade resultante do processo de ablação, o controle da propagação térmica e da elevação de temperatura e

ausência de atrito, têm sido as principais características indutivas ao uso do *laser*^{8,13,15,21}.

A respeito do *laser* de Er,Cr:YSGG, pouco temos visto na literatura em relação ao seu uso em osteotomias, entretanto, baseados na teoria hidrocínética proposta por Fried⁵, onde o spray de água do equipamento potencializa o efeito ablativo e melhora a dissipação do calor, intui-se que pode haver benefícios quando da sua utilização em tecidos ósseos.

Embora a teoria hidrocínética de Fried⁶, seja consistente, não há clareza sobre o mecanismo preciso da ablação provocada pelo *laser* Er,Cr:YSGG. Alguns autores^{13,21} acreditam na ablação direta do *laser* no tecido ósseo, e outros defendem a posição de que a forte absorção do *laser* de Er,Cr:YSGG pela água, convertida em energia térmica, causa alta concentração de calor, até que o ponto de ebulição da água seja atingido, determinando uma explosão. No trabalho de Wang et al²⁶, realizado em 2002, ambas as possibilidades foram consideradas, uma vez que tanto carbonização e derretimento, como camadas necróticas transparentes estavam presentes nas peças estudadas.

Estudando os efeitos da ablação do *laser* Er, Cr: YSGG, na mandíbula de cães, Kimura¹² em 2001, afirmou que o *laser* Er,Cr:YSGG é capaz de cortar efetivamente sem queimar, derreter ou alterar a taxa de cálcio e fósforo, do osso irradiado.

Osteotomias com Er:YAG e CO₂ *superpulse*, foram alvo de investigação na literatura e demonstraram ser dois comprimentos de onda passíveis de serem

utilizados no tecido ósseo, sendo que para ambos os *lasers* são citadas áreas de carbonização e derretimento^{4,16,20}.

Outros estudos^{5,7,9} demonstraram o potencial ablativo do *laser* de Er,Cr:YSGG, frente aos tecidos duros dentais, mostrando que sua utilização é segura e eficaz.

Com um comprimento de onda de 2,78 μm , o *laser* Er,Cr:YSGG, têm forte interação com a hidroxiapatita e a água, sendo ideal para a utilização em tecidos duros^{11,28}.(Figura 01.). Especificamente em tecidos ósseos os estudos concentram-se na implantodontia, verificando a eficácia dos *lasers* de Er:YAG e Er,Cr:YSGG, na descontaminação de implantes e pequenas osteotomias, demonstrando que a utilização do *laser* sobre tecido ósseo é viável e passiva de reparo^{14,23,24}.

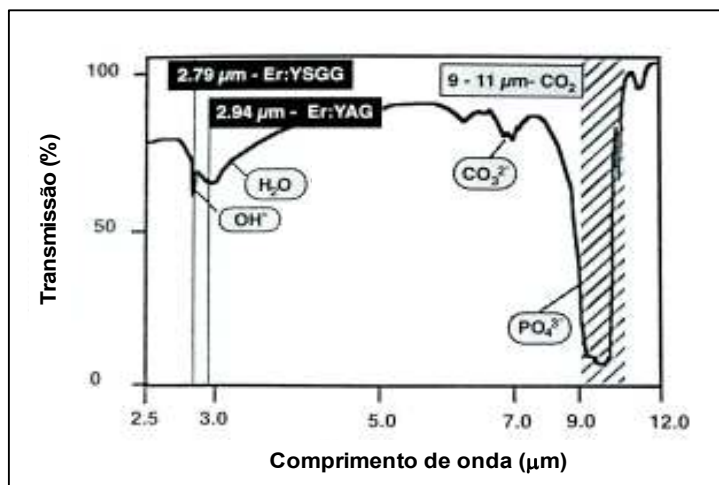


Figura 01 - Espectro de transmissão do esmalte dental, mostrando as bandas de absorção da água, radical hidroxila, carbonato e fosfato.⁶

Assim, através do mecanismo de fotoablação a luz *laser* interage com a água do tecido de forma explosiva retirando pequenas quantidades de substância

óssea, por pulso^{3,27,28}. Esse processo de forma repetida pode mimetizar, ampliando ou reduzindo suas qualidades, o efeito de uma broca cirúrgica, conduzindo a osteotomias precisas e com pontencial reparador usual^{12,26,23}.

Em um estudo sobre o processo de reparação em perfurações feitas na mandíbula de coelhos com o *laser* de Er,Cr:YSGG, Wang²⁵ verificou um reparo padrão, sem alterações significativas frente aos estudos que descrevem o reparo das feridas ósseas por instrumentos rotatórios. Em bovinos as conclusões foram semelhantes²⁶.

A utilização de *laser* de Er, Cr:YSGG, como substituto ou alternativa à broca cirúrgica, é alvo de nossa investigação.

2. OBJETIVO

Avaliar a interface compreendida entre bloco ósseo de tíbia de coelho enxertado na própria tíbia, utilizando-se o *laser* de Er,Cr:YSGG ou broca 701, nas osteotomias, comparando, ao longo do período de reparação (45 dias), o padrão da interface, preenchimento espacial com osso neoformado e aspecto dos bordos do enxerto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa em animais do IPEN sob nº. 06/CEPA – IPEN/SP.

As irradiações com o equipamento *laser*, foram efetuadas nas instalações do laboratório de Biofotônica, da Centro de *Lasers* e Aplicações do IPEN.

A origem e armazenamento dos animais, durante todo o experimento, se deu no biotério da Faculdade de Medicina da USP.

O processamento das amostras sob microscopia eletrônica de varredura, foi feito no laboratório do Centro de Caracterização e Tecnologia de Materiais – CCTM, utilizando equipamento Phillips North Holland.

O processamento e interpretação das amostras histológicas foi feito no Departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Faculdade de São Paulo – FOU SP.

3.1 Seleção das Amostras

Foram utilizados nesse estudo 09 coelhos New Zealand fêmeas, com massa variando entre 4,5 e 5,5 kg e idade entre 10 e 14 meses. Os coelhos foram identificados com tatuagem na face interna de suas orelhas e as gaiolas identificadas com tarjetas plásticas, determinando número do animal, data de execução do experimento e momento selecionado para o sacrifício.

Conforme a figura 02 os 09 coelhos foram divididos em três grupos com 03 animais, nos quais cada um deles foi operado para a enxertia, nas duas condições, com broca, ou seja, o controle (B) e com *laser* (L), uma em cada tibia resultando 06 amostras p/ grupo. Para a análise qualitativa da interface dos blocos de enxerto, os animais foram sacrificados em tempos diferentes, de acordo com a divisão dos grupos, sendo: grupo 15 dias (A15), sendo 30 dias (A30) e grupo 45 dias (A45).

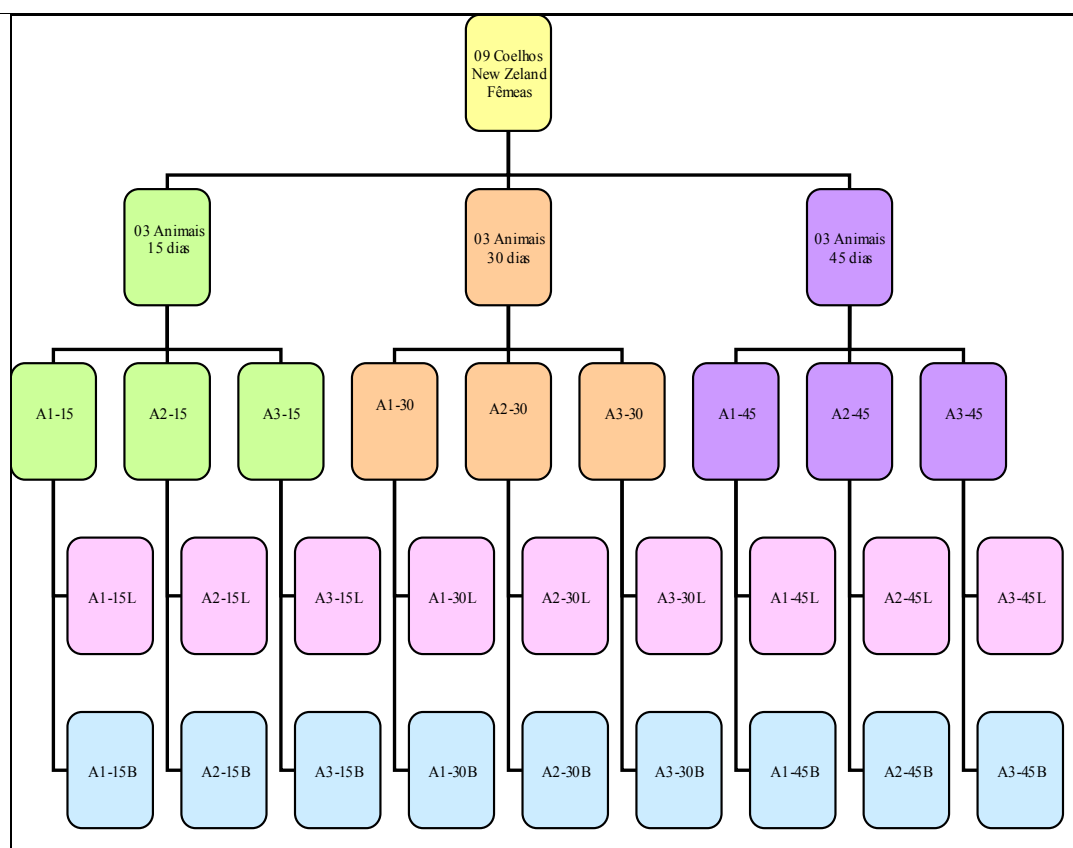


Figura 02 – Organograma demonstrativo dos grupos de animais e condição do experimento utilizados na pesquisa.

As peças dos animais 01 de cada grupo (15, 30 e 45 dias), foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV), em 04 aumentos e posições diferentes:

- Visão panorâmica da interface: Aumento original de 13 X;
- Visão específica da interface esquerda: Aumento original de 100X;
- Visão específica da interface central: Aumento original de 100X;
- Visão específica da interface direita: Aumento original de 100X;

O corte das peças anatômicas para obtenção das superfícies de exame, foi obtido a partir de uma secção transversal em relação ao longo eixo da peça óssea, objetivando visualizar o corpo do enxerto, o corpo da tíbia e a área de interesse que é a interface tíbia/enxerto. (Figura 03).

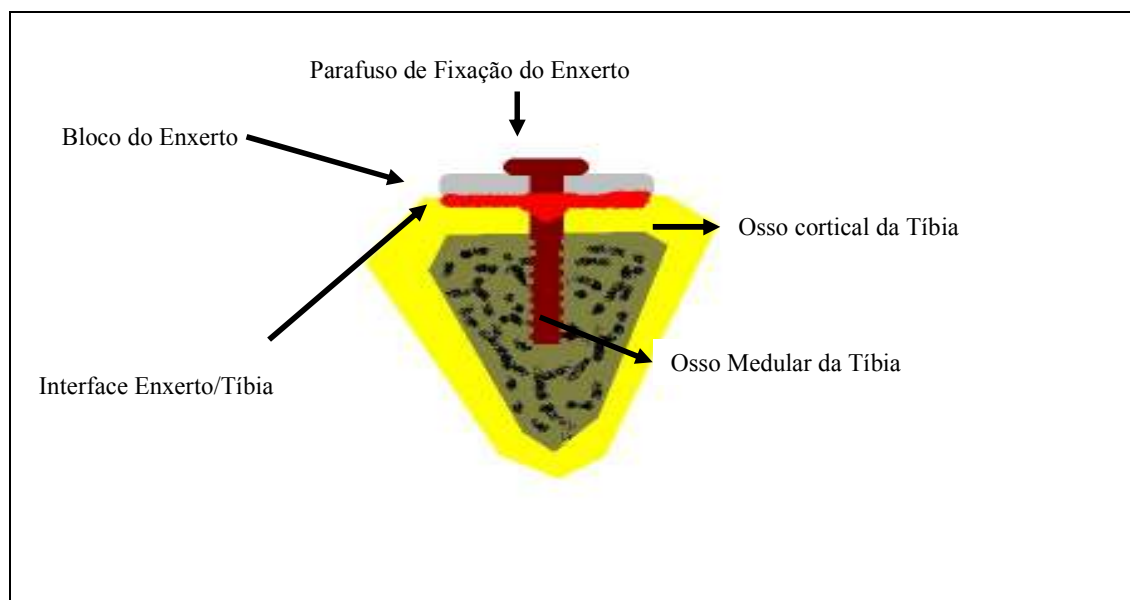


Figura 03 – Demonstração esquemática da peça obtida para análise sob Microscopia Eletrônica de Varredura.

As imagens analisadas foram obtidas conforme o esquema abaixo:

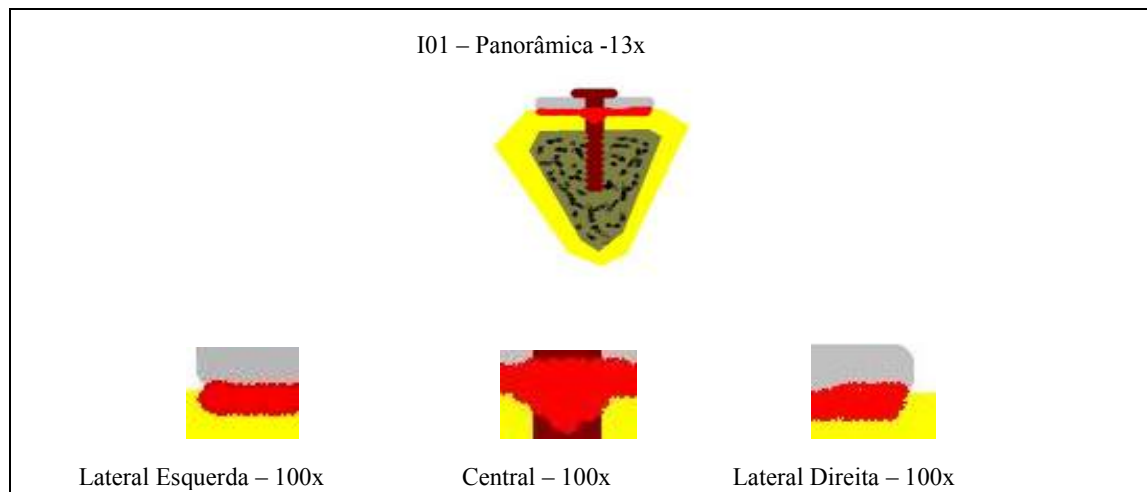


Figura 04 – Vista da secção transversal das áreas que foram examinadas e seus respectivos aumentos.

As peças dos animais 02 e 03 de cada grupo (15, 30 e 45 dias), foram destinadas à análise em microscopia óptica e as lâminas confeccionadas a partir de cortes seriados dessas peças, totalizando 03 lâminas por condição (controle e *laser*), resultando 36 lâminas. Imagens de áreas de interesse foram obtidas por meio de fotografia digital direta a partir do microscópio óptico.

No grupo experimental, foi utilizado um *laser* de Er,Cr:YSGG, modelo Waterlase[®] da marca americana Biolase, emitindo um comprimento de onda de $\lambda = 2,78 \mu\text{m}$, largura de pulso de $150\mu\text{s}$ e taxa de repetição de $20 \text{ Hz}^{16,27}$. A potência utilizada foi de 5W no monitor e a energia do pulso medida foi de 200mJ, entregue por uma ponta de safira G6, com diâmetro de feixe de $600\mu\text{m}$. A calibração de ar/água, seguiu respectivamente 100% e 90%.

Os valores de energia por pulso foram medidos antes de cada irradiação, por meio de um medidor de potência e energia *Power/Energy Meter*, modelo *Field Master - Coherent®*, USA, como a média de 10 pulsos, resultando nos 200mJ mencionados e 7,1 J/cm².

As condições de irradiação foram definidas em função dos valores encontrados na literatura^{14,15}, assim como durante um experimento piloto onde irradiou-se tíbia e mandíbula de coelho in vitro, conforme figura 05.

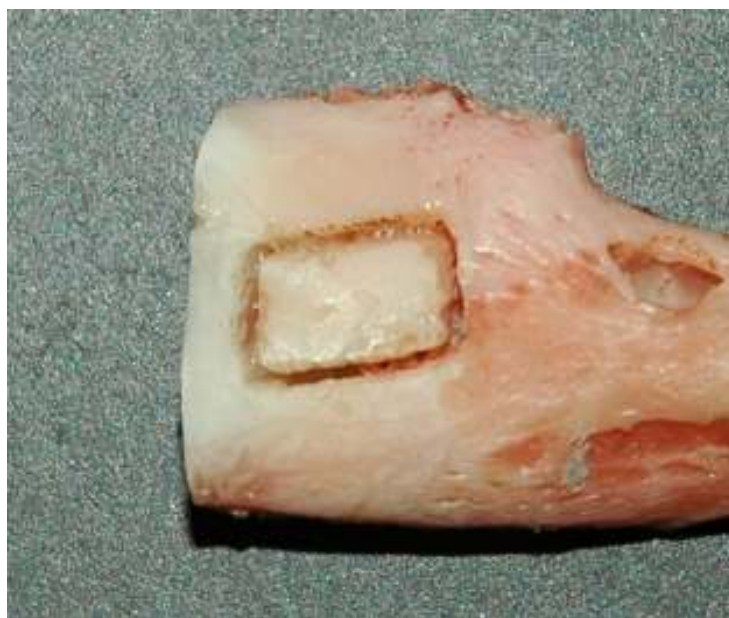


Figura 05 – Imagem da área óssea de mandíbula de coelho irradiada por Er,Cr:YSGG, com 5W de potência, no estudo piloto.

Para o grupo controle, brocas 701 de tungstênio, da marca Kommith, foram utilizadas, conforme protocolo cirúrgico definido pela literatura^{1,15}.

3.2 Protocolo de Anestesia e Medicação:

Para uma anestesia segura e eficiente, proteção antimicrobiana e alívio da dor, utilizamos o protocolo descrito abaixo:

Vetanarcol® (Cloridrato de Ketamina) – 1ml/Kg – Anestésico

Rompum® (Cloridrato de Xilazina) – 1ml/Kg – Anestésico

Anestésico Local® – lidocaína 2% sem vaso constritor – in loco

Baytril 10%® (Enrofloxacina) – 2,5mg/Kg – Antimicrobiano – 1hora antes do procedimento;

Ketofen® (Ketoprofeno) – 2,2 mg/Kg – Antiinflamatório/Analgésico – 1x o dia por 03 dias.

3.3 Técnicas Cirúrgicas:

Foram realizadas tricotomias crânio-caudais na face interna e anterior das tíbias dos animais, com o intuito de prover um campo cirúrgico livre de pêlos.



Figura 06 – Tricotomia pré-cirúrgica

Os coelhos foram imobilizados numa calha cirúrgica desenvolvida justamente para as cirurgias em coelhos.

Uma gaze para antissepsia com povidine-iodine foi utilizada, para degermação da superfície cutânea e determinação da superfície livre ao procedimento cirúrgico.



Figura 07 – Calha de contenção para cirurgia em coelhos

A cirurgia consistiu de uma abordagem cutânea e muscular de aproximadamente 3 cm na região medial da tíbia, próximo à epífise que articula-se com o fêmur, visando a exposição óssea.



Figura 08 – mesa de procedimento cirúrgico

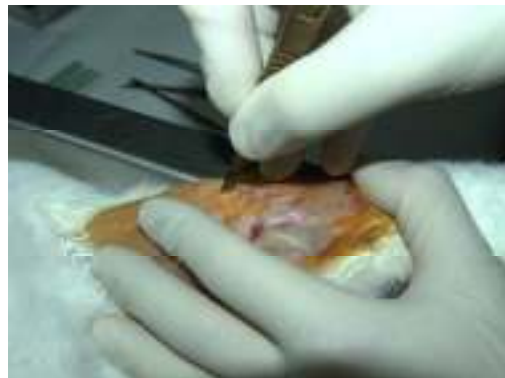


Figura 09 – Incisão cutânea

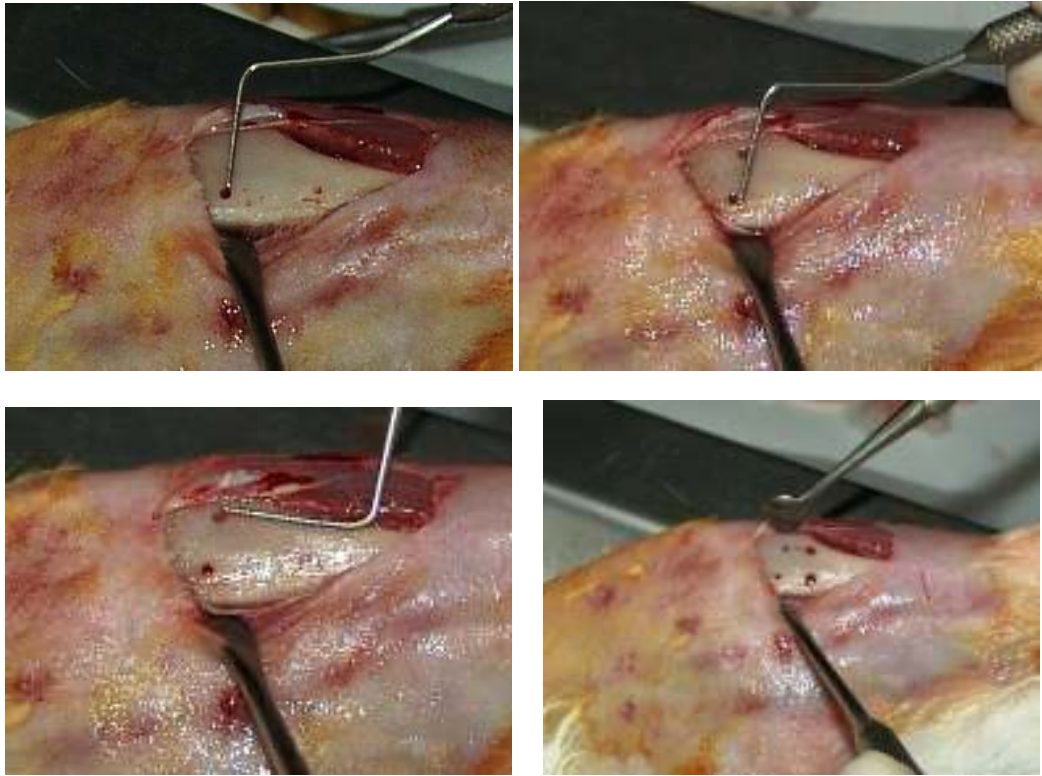


Figura 10 – Medida da incisão cutânea



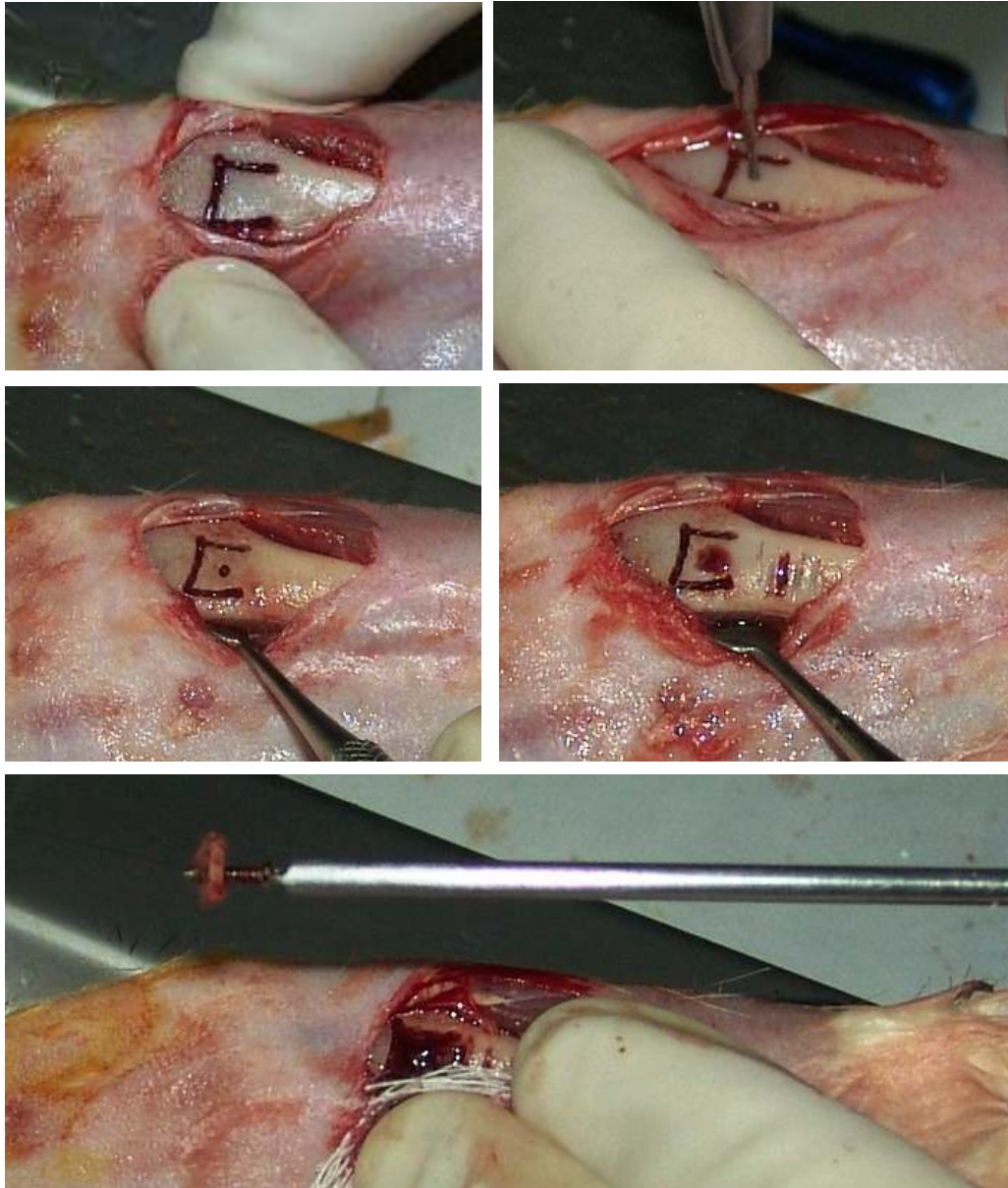
Figura 11 – Exposição da tíbia

Com a região óssea exposta, procedeu-se um corte ósseo de forma retangular, medindo 5mm de largura, por 7mm de extensão e profundidade de aproximadamente 2mm, até que o sangramento proveniente da medular seja observado, sempre guiados por um gabarito metálico, suficiente para atingir a camada medular.



Figs. 12 a 15 . Marcações dos limites do enxerto que será retirado. 7mm x 5mm.

Antes da remoção completa do bloco ósseo, uma perfuração central para a passagem do parafuso de fixação do enxerto foi confeccionada, evitando ao máximo a manipulação do enxerto após sua retirada do local de origem. Os blocos obtidos das osteotomias foram retirados com ajuda de elevadores e então suas arestas aparadas.



Figs. 16 a 20. Osteotomias realizadas, instalação do parafuso e destacamento do enxerto.

Foi respeitado um espaço de 2mm por distal da área de retirada do bloco, e então criado o leito receptor do mesmo, que teve as mesmas dimensões do enxerto extraído e consistiu de uma área composta por linhas horizontais de

descorticalização, na profundidade de aproximadamente 01 mm e também um orifício central para a passagem do parafuso de fixação.

Em seguida, o enxerto foi fixado, nessa área preparada, com um parafuso de titânio de 1,5mm de diâmetro e 5mm de comprimento.

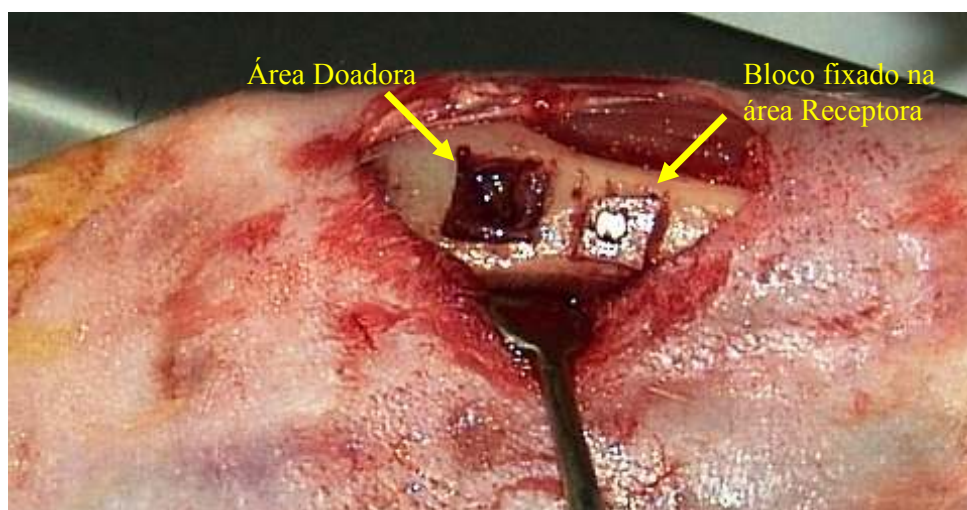
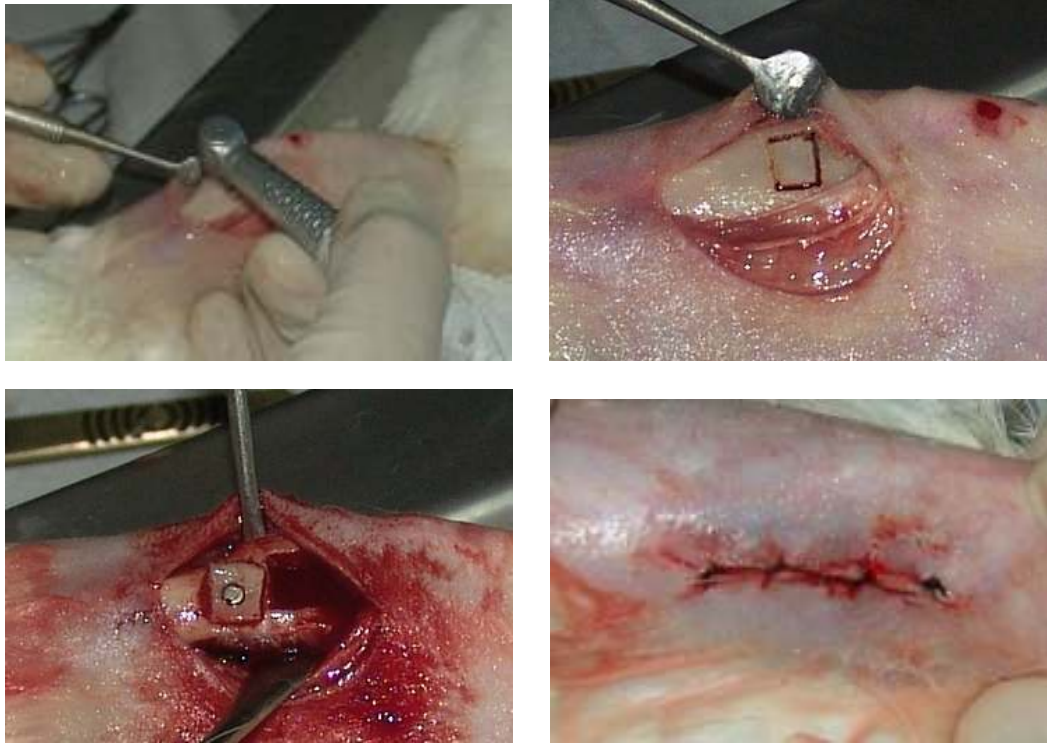


Fig. 21 – Enxerto concluído e adaptado sobre a área receptora.

Não foi necessária a marcação da área operada devido à presença do parafuso, que permaneceu no local até o respectivo período de sacrifício, informando a localização do sítio cirúrgico

A técnica foi efetuada seguindo os mesmos padrões em ambos os lados, e apenas diferiu em função do equipamento de corte e preparação óssea, que foi utilizado, a broca 701 ou o *laser* Er,Cr:YSGG, conforme parâmetros já anteriormente mencionados. A tíbia direita sofreu intervenção com *laser* e a tíbia esquerda com broca, no mesmo ato cirúrgico. As incisões foram suturadas com fios de seda 4.0.



Figs. 22 a 25. Imagens do experimento efetuado com *laser* Er,Cr: YSGG.

Após a cirurgia os animais receberam os cuidados de nutrição e higiene adequados à sua manutenção.

O sacrifício seguiu o cronograma de 15, 30 e 45 dias, que foi realizado nas instalações do biotério da faculdade de medicina da USP, e a técnica utilizada foi por dose letal de anestesia, correspondendo a 5X a dose terapêutica. Uma vez sacrificado, as porções das tíbias foram retiradas com uma margem de segurança de 05 mm para cada lado da intervenção cirúrgica, com o auxílio de uma serra para osso. Imediatamente se iniciou o processamento das mesmas para análise sob Microscopia Eletrônica de Varredura e Histologia sob Microscopia de Luz.

3.4 Preparação para a Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

Imediatamente após a remoção das peças as mesmas foram lavadas em solução salina e então fixadas em formalina a 10%, por 24 horas, respeitando a proporção de volume de 5/1 de fixador, em relação à peça submersa.

Posteriormente as peças foram lavadas em água corrente por 12 horas e então desmineralizadas em ácido clorídrico por 24 horas, sendo que o grau de desmineralização foi testado mecanicamente com o auxílio de um instrumento pontiagudo. Havendo perfuração da peça, sem resistência, o grau de desmineralização foi considerado adequado. A média de tempo necessário para a desmineralização adequada foi de 24 horas.

O próximo passo foi a desidratação das peças em seqüência alcoólica desde uma concentração de 70% a 100%, ficando as peças submersas por um período de 12 h em cada concentração, partindo do álcool menos concentrado para o absoluto. A imersão em álcool absoluto foi repetida para segurança da desidratação. Uma vez desidratadas pelo álcool, as peças foram mantidas num recipiente com baixa umidade, contendo sílica gel por 48 horas.

Após perfeitamente secas, as peças foram seccionadas transversalmente próximas ao parafuso de fixação do enxerto. Esse procedimento foi efetuado com uma lâmina de bisturi nº. 15, expondo a interface osso/enxerto.

Uma vez a peça seccionada na interface de observação, as mesmas foram fixadas à suportes identificados e então receberam deposição de um filme fino de ouro-paládio, para permitir a visualização sob microscopia eletrônica de varredura.

Uma imagem inicial, fornecendo uma visão panorâmica da peça, sob aumento original de 13X foi obtida. Após a obtenção da imagem, outras três, agora no aumento original de 100x, foram obtidas e referiam-se às porções, direita, esquerda e central da peça, sempre levando em consideração o foco na interface osso/enxerto.

As fotos foram identificadas segundo a condição de tratamento, período de sacrificio e posição avaliada.

Todas as fotos foram gravadas em mídia digital e impressas para a avaliação qualitativa da interface.

3.5 – Preparação para Análise Histológica sob Microscopia de Luz

As peças selecionadas para análise histológica sob microscopia de luz foram preparadas através de desmineralização e coloração ácido-base com Hematoxilina e Eosina, conforme o protocolo abaixo:

1º. Descalcificação: as peças foram imersas em ácido fórmico a 20% durante 72 horas, após os parafusos de fixação do enxerto foram retirados e as peças retornaram para a imersão ácida por 96 horas, totalizando 07 dias.

2º. Desidratação: as peças nessa fase foram tratadas por banhos seriados de álcool em concentrações de 70%, 80%, 90% e 100%, permanecendo uma hora em trinta minutos imersas em cada concentração.

3º. Diafanização: as peças permaneceram imersas em Xylol, em dois banhos de uma hora e trinta minutos;

4º. Inclusão: para a inclusão na parafina dois banhos de impregnação de uma hora e trinta minutos cada foram necessários;

5º. Corte: incluídos em cassetes específicos as peças foram cortadas seriadamente por micrótomo Jung, resultando em cortes com espessura de 7 μ m;

6º. Pescagem: na espessura adequada os cortes foram passados no banho Maria, pescados e esticados sobre lâminas de vidro para microscopia de luz;

8º. Coloração: os cortes foram corados com hematoxilina por imersão durante cinco minutos e na seqüência receberam o corante de eosina por mais um minuto;

9º. Montagem: Uma vez sobre as lâminas de vidro e coradas, a finalização da montagem foi efetuada através do equipamento Tissue Tek, onde uma fita de poliuretano foi aplicada sobre os cortes.

3.6 Avaliações:

Para ambas as técnicas de utilizamos a avaliação qualitativa morfológica das imagens obtidas.

Na análise sob microscopia eletrônica de varredura, um estudo morfológico da interface foi efetuado, buscando observar maior grau de contato entre osso neoformado e enxerto, assim como entre o osso neoformado e o osso original. A regularidade da superfície do enxerto e a adaptação do mesmo também foram observadas.

Nas análises histológicas sob microscopia de luz, foram observados a regularidade da formação óssea da interface, assim como o padrão de formação do mesmo. Áreas de tecido com plastos vazios, linhas de osteoblastos ativos e linhas basofílicas de aposição foram os alvos de nossa observação.

RESULTADOS

4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Sacrifício 15 dias – Condição: Broca

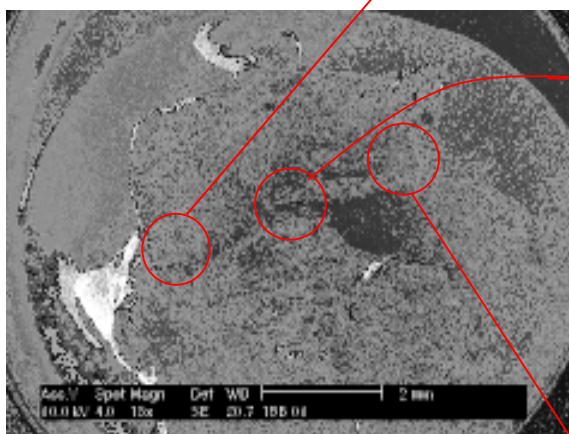


Fig. 26 – Visão panorâmica do bloco ósseo enxertado e dá área receptora.

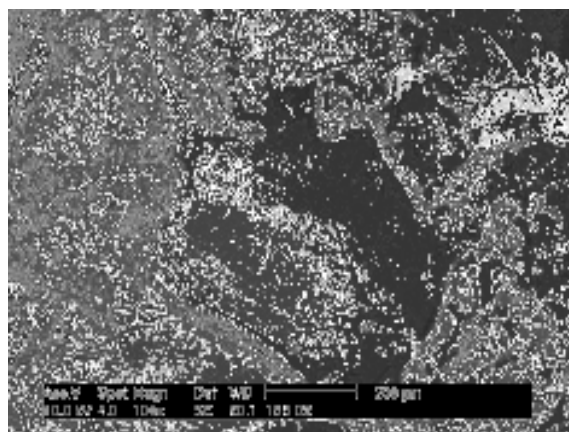


Fig. 27 – Detalhe da interface à esquerda.

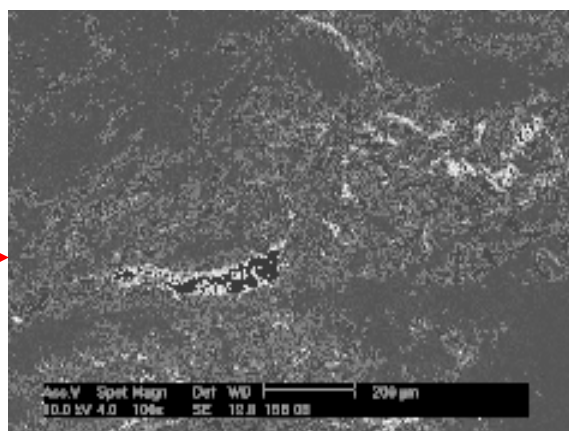


Fig. 28 – Detalhe da interface região central

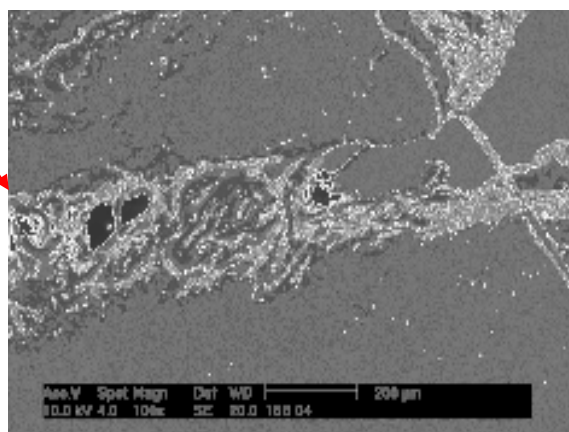


Fig. 29 – Detalhe da interface à direita

Observa-se um grau moderado de adaptação enxerto/osso, e uma interface irregular, característico dessa fase. Nota-se também um aspecto bem marcado entre o final do osso receptor e o início do osso enxertado, não se evidenciando grande volume de osso neoformado. As bordas do enxerto encontram-se com ângulos bem agudos, marcando bem as extremidades do enxerto. Num aumento maior, não é possível identificar tecido neoformado atapetando o enxerto, e nota-se inclusive a presença de espaços vazios na interface. (Fig. 26-29)

Sacrifício de 15 dias – Condição: *Laser*

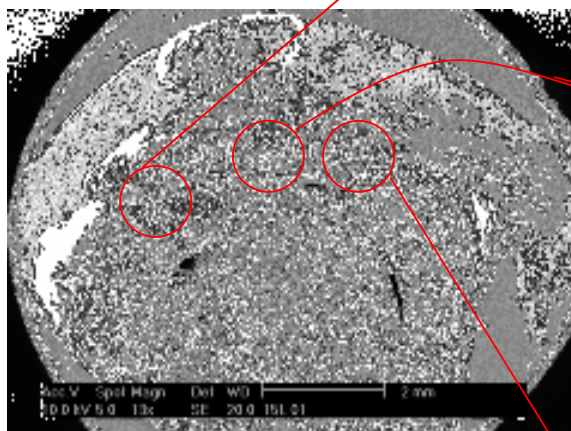


Fig. 30 – Visão panorâmica do bloco ósseo enxertado e dá área receptora.

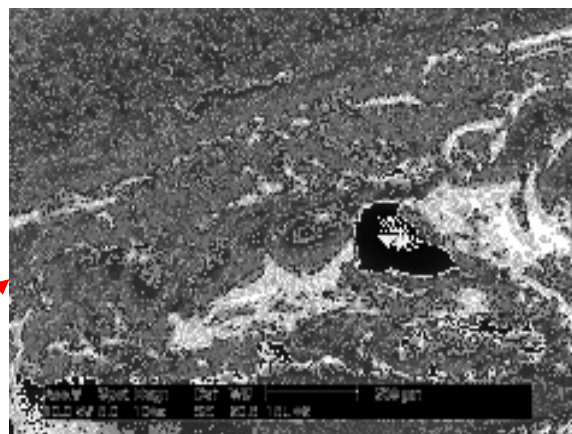


Fig. 31 – Detalhe da interface à esquerda.

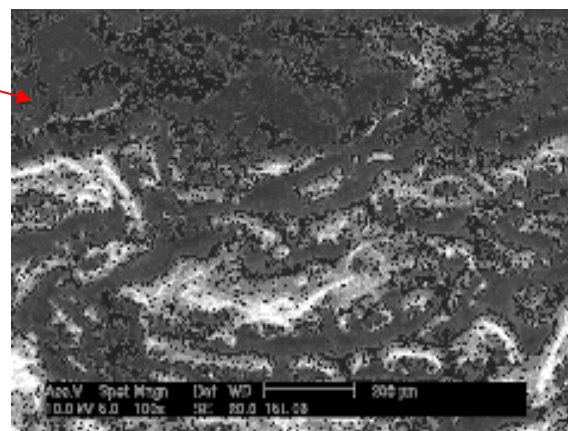


Fig. 32 – Detalhe da interface região central

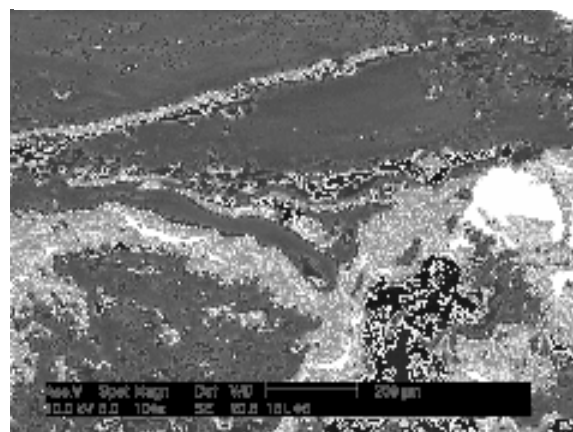


Fig. 33 – Detalhe da interface à direita

Observa-se nessa condição o enxerto sobreposto à uma massa densa de tecido neoformado. As extremidades do enxerto preservam forma próxima a original, não evidenciando ângulos agudos ou absorções. Ao exame mais detalhado percebe-se que há tecido neoformado próximo à ambas as estruturas, ou seja junto ao enxerto e junto ao osso receptor. Não há evidências de grandes espaços vazios e nota-se uma grande área de neoformação coincidente com o longo eixo do parafuso de fixação do enxerto.(Fig. 30-33)

Sacrifício de 30 dias – Condição: Broca:

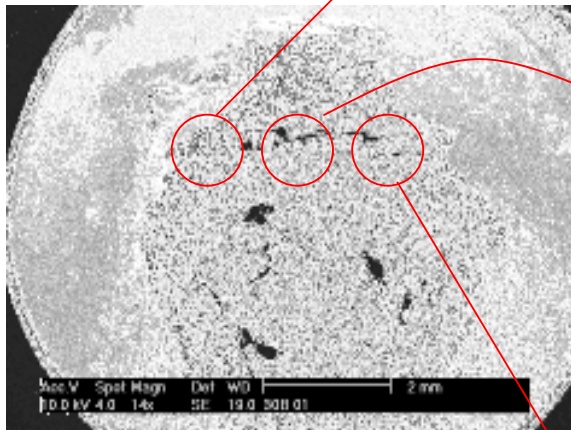


Fig. 34 – Visão panorâmica do bloco ósseo enxertado e da área receptora.

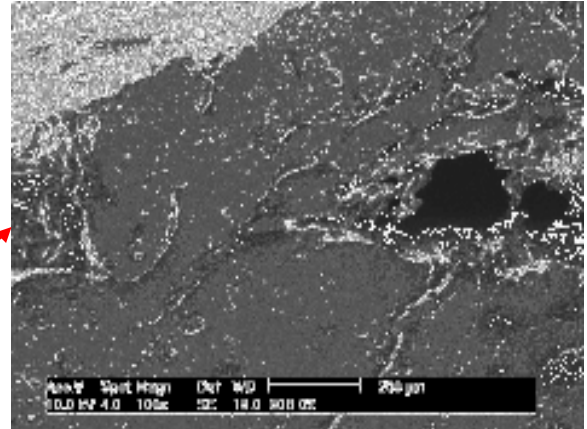


Fig. 35 – Detalhe da interface à esquerda.

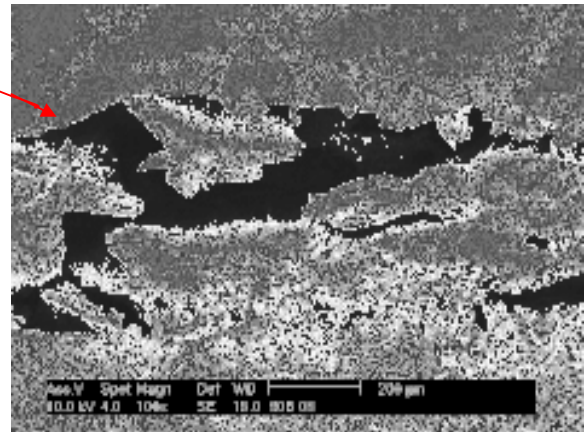


Fig. 36 – Detalhe da interface região central

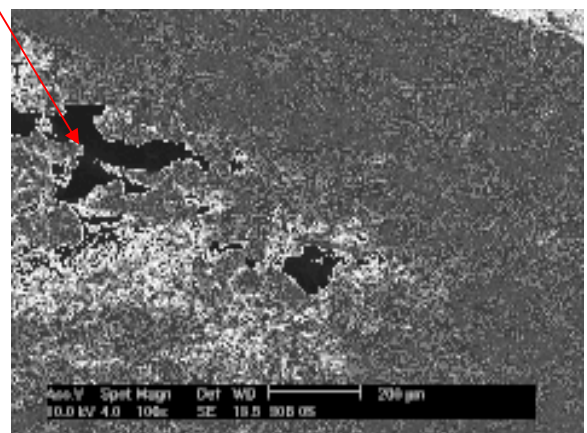


Fig. 37 – Detalhe da interface à direita

Observa-se a presença de espaços vazios, mostrando áreas sem preenchimento por tecido ósseo neoformado e uma adaptação pobre do enxerto à superfície óssea receptora. A interface encontra-se nítida em aproximadamente 80% da sua extensão, no restante nota-se perda de nitidez da mesma sugerindo integração osso/enxerto. (Fig. 34-37).

Sacrifício de 30 dias – Condição *Laser*

r

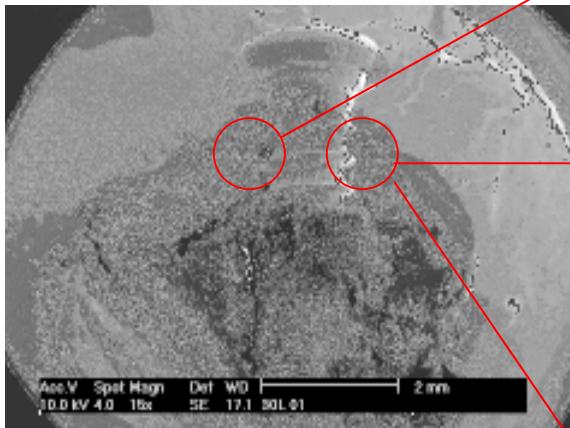


Fig. 38 – Visão panorâmica do bloco ósseo enxertado e dá área receptora.

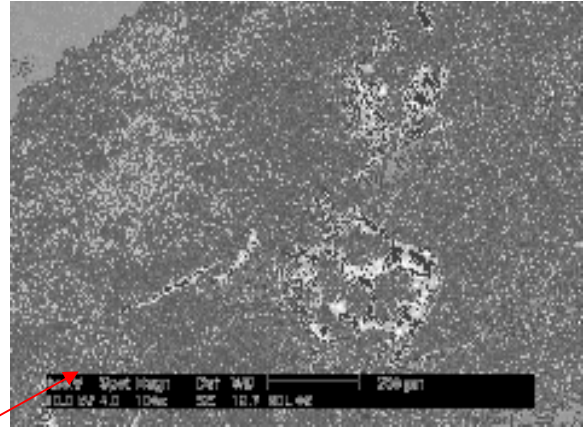


Fig. 39 – Detalhe da interface à esquerda.

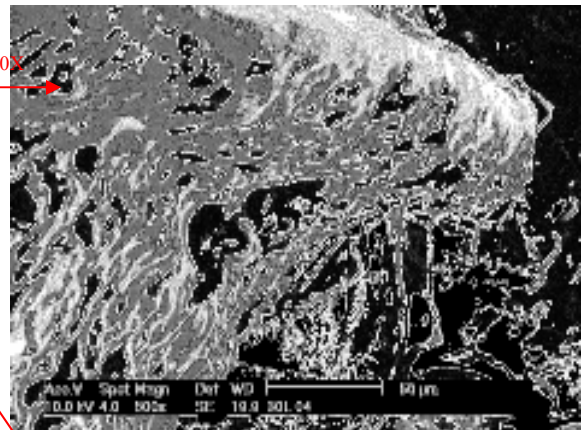


Fig. 40 – Detalhe do parafuso de fixação.

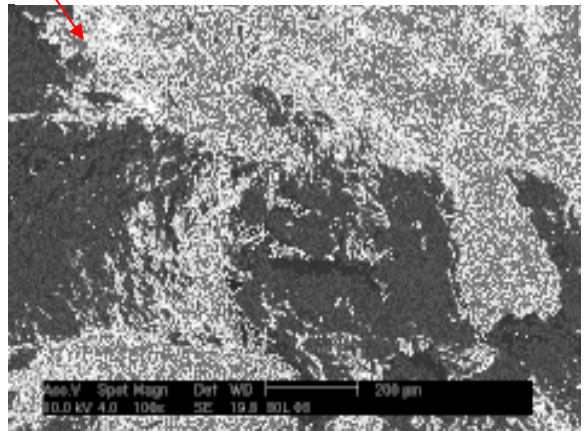


Fig. 41 – Detalhe da interface à direita

Na condição *laser*, apesar da perda de porção da estrutura, na região frontal ao parafuso, por artefato de preparação da peça, fica nota-se a superioridade de formação óssea na interface osso/enxerto. Não existem espaços vazios evidentes e se percebe uma linha muito tênue marcando a interface, que têm sua identificação dificultada pela boa qualidade da adaptação do tecido ósseo ao enxerto. (Fig. 38-41)

Sacrifício de 45 dias – Condição: Broca

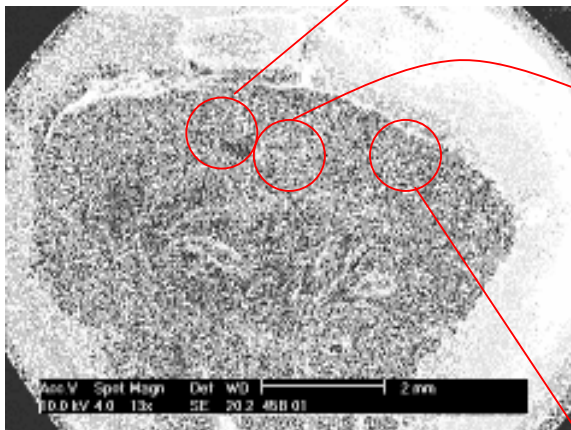


Fig. 42 – Visão panorâmica do bloco ósseo enxertado e dá área receptora.

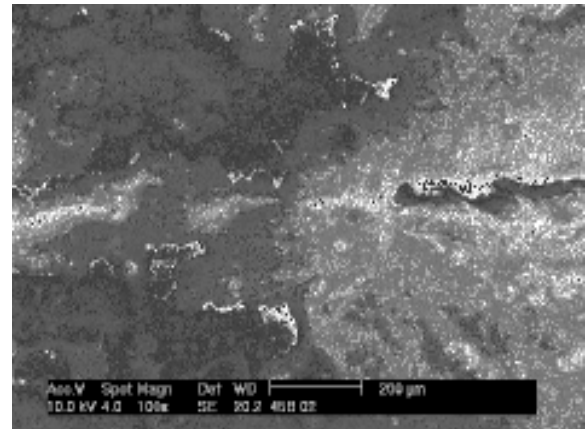


Fig. 43 – Detalhe da interface à esquerda.

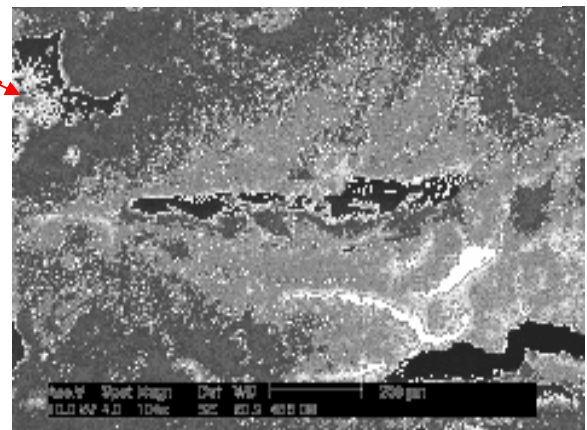


Fig. 44 – Detalhe da interface região central

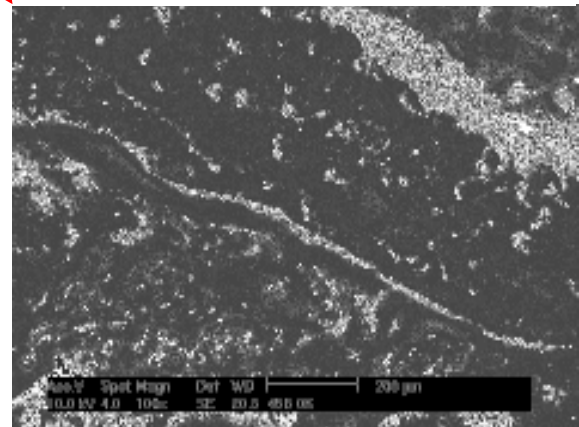


Fig. 45 – Detalhe da interface à direita

Observa-se a integração quase completa entre enxerto e osso receptor. A linha de interface se oculta por completo nas extremidades do enxerto e ambas as porções ósseas tendem a formar um bloco sólido, com uma pequena separação central apenas. Não se evidenciam espaços vazios e as porções finais do enxerto encontram-se perfeitamente adaptadas ao corpo ósseo da tíbia, não sendo possível determinar seus limites (Fig. 42-45).

Sacrifício de 45 dias – Condição: *Laser*

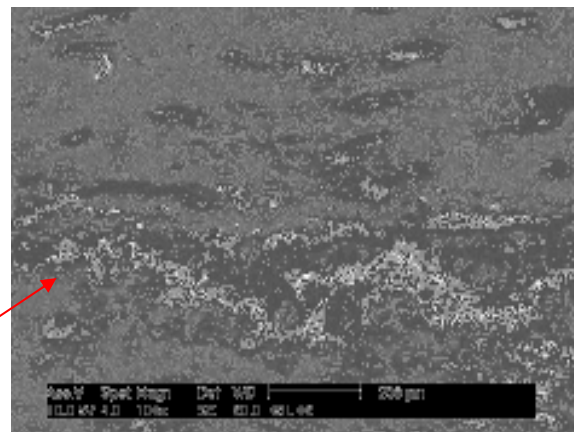


Fig. 47 – Detalhe da interface à esquerda.

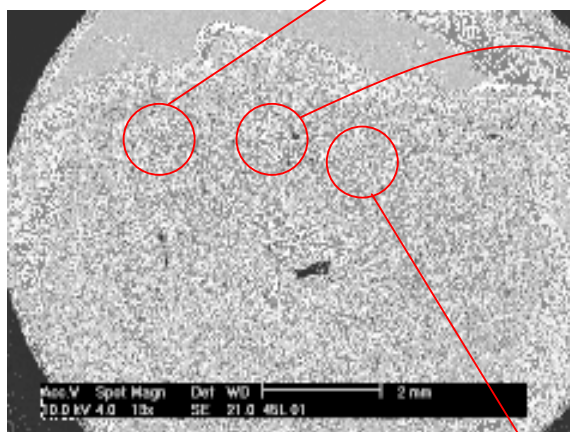


Fig. 46 – Visão panorâmica do bloco ósseo enxertado e dá área receptora.

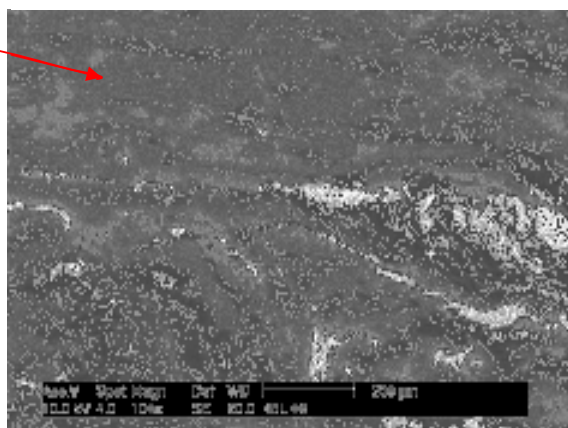


Fig. 48 – Detalhe da interface região central

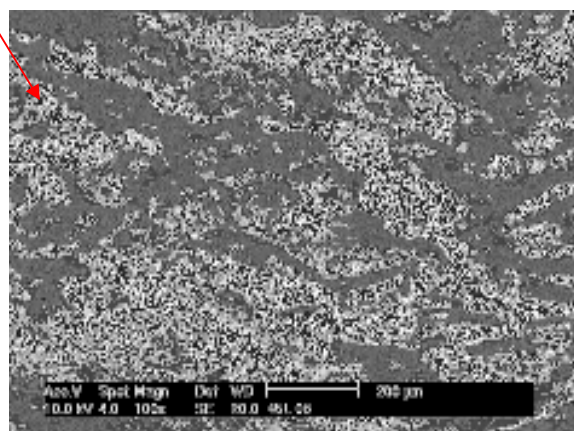


Fig. 49 – Detalhe da interface à direita

Observa-se total integração entre as estruturas do enxerto e do osso receptor. Não há nitidez nas extremidades do enxerto, dificultando a identificação da interface e mostrando boa qualidade de neoformação óssea, com exceção de uma pequena área central, toda a interface restante encontra-se perfeitamente consolidada. (Fig. 46-49)

4.2 Microscopia de Luz

Sacrifício 15 dias – Condição: Broca.

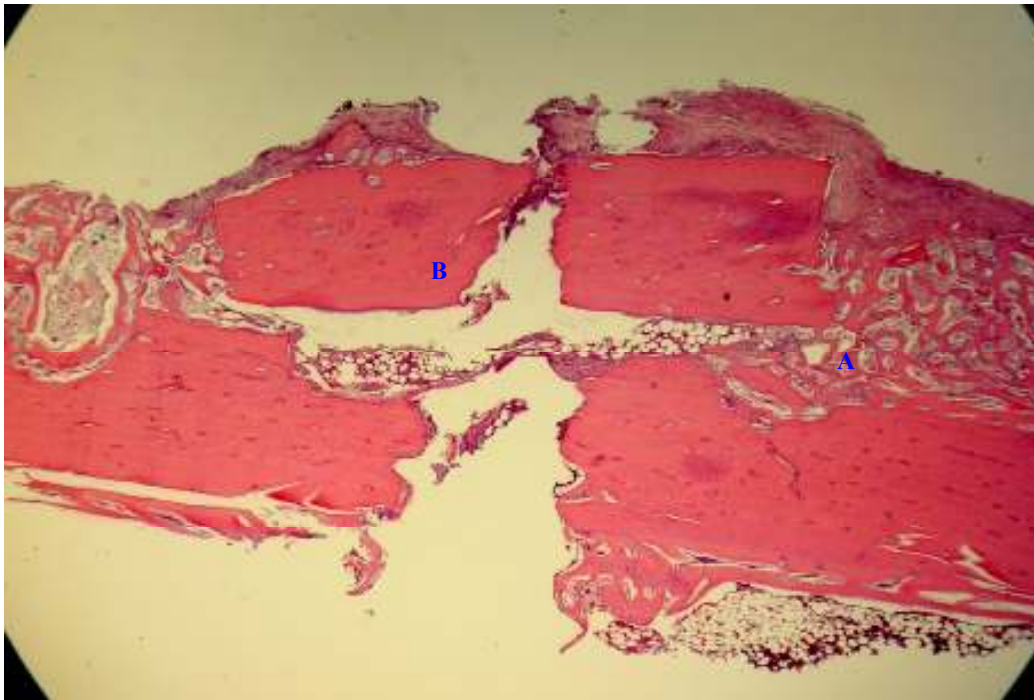


Fig. 50 – Aumento Original de 10x. Vista panorâmica do bloco enxertado, interface e leito ósseo receptor.

Na figura 50, pode-se ver o bloco enxertado, assim como seus limites. Não há sinais de carbonização e nota-se atividade osteoblástica acentuada na periferia do bloco enxertado. Na porção central observam-se áreas sem indícios de neoformação óssea, percebe-se também a presença de osso medular na interface . As fileiras de osteoblastos ativos são evidentes e linhas de aposição reversa também são observadas. *laser*

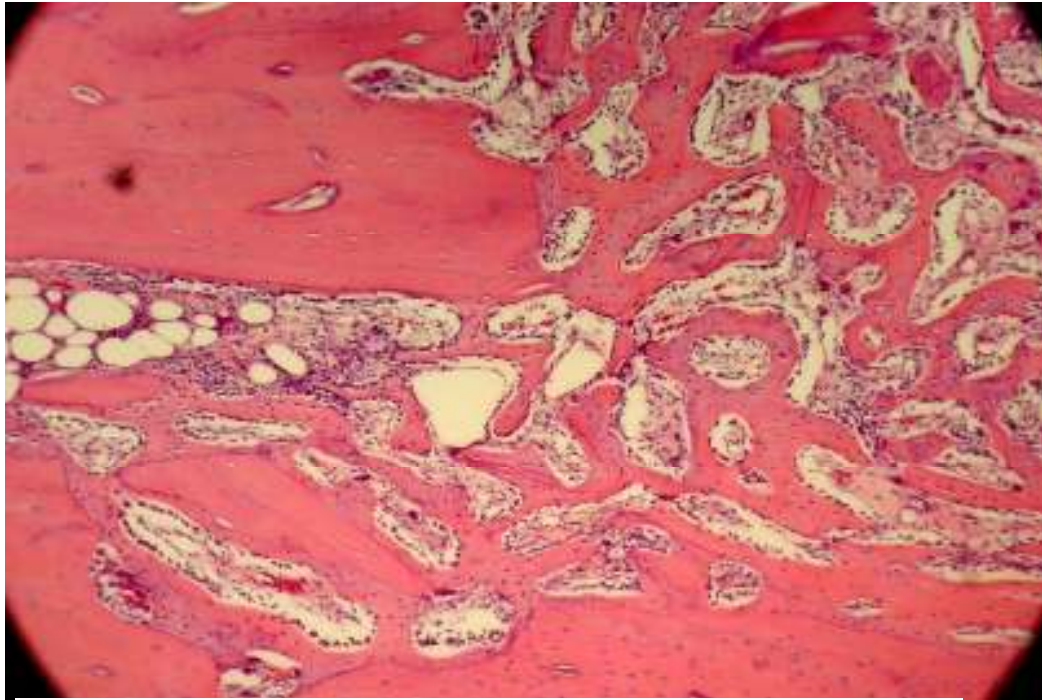


Fig. 51 – Aumento original de 40x. Vista ampliada do ponto A localizado na figura 50.

Vê-se na figura 51, o tecido osteóide neoformado, com grande número de osteócitos aprisionados e muitos osteoblastos na periferia das trabéculas são observadas.

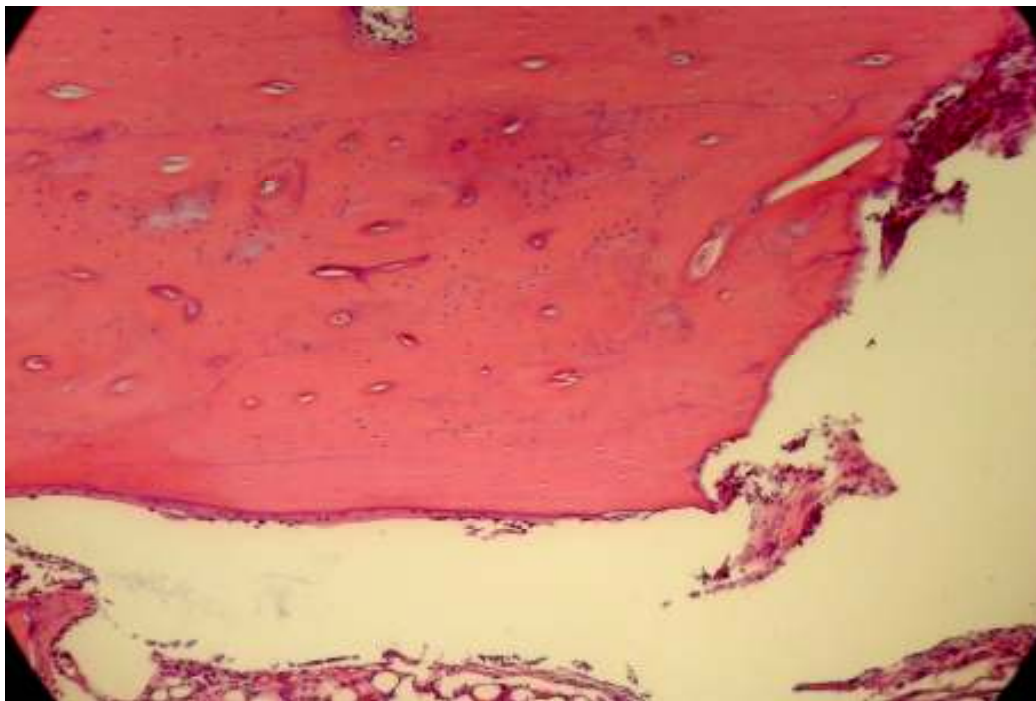


Fig. 52 – Aumento original de 40x. Vista ampliada do ponto B localizado na figura 50.

Bordas do enxerto definidas e presença de espaços na interface. Nota-se início de formação óssea a partir da região receptora, mas não do bloco enxertado. (Fig. 52).

Sacrifício 15 dias – Condição: *Laser*

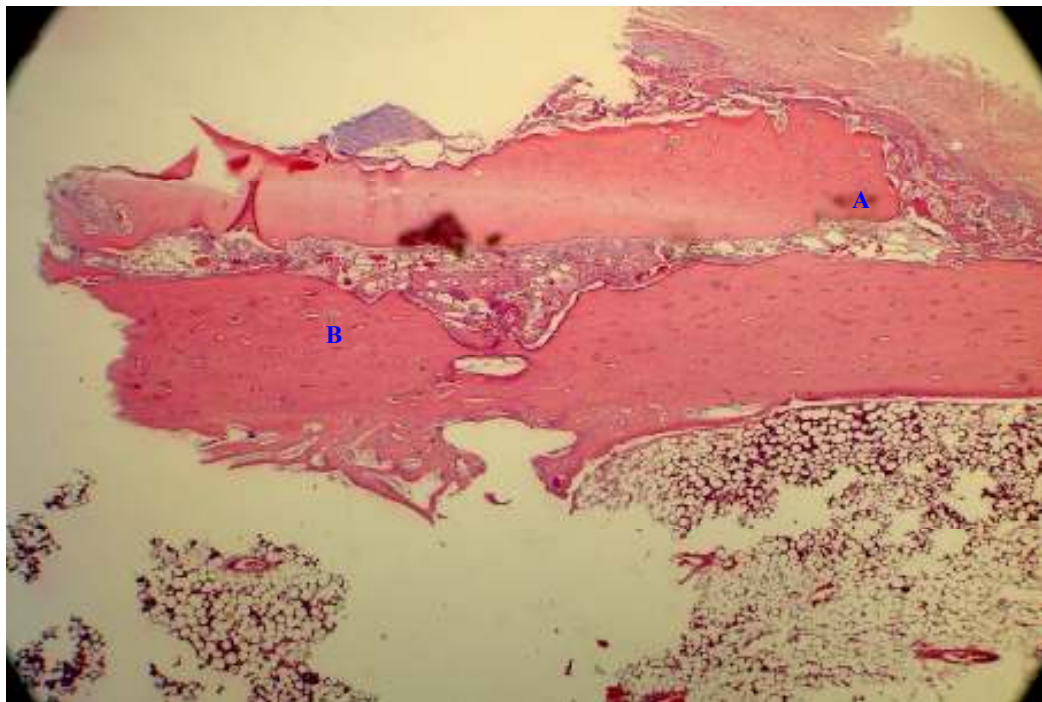


Fig. 53 –Aumento original de 10x. Vista panorâmica do bloco enxertado, interface e leito ósseo receptor.

É possível visualizar-se nitidamente o bloco enxertado, assim como seus limites. Não há sinais de carbonização e nota-se atividade osteoblástica acentuada na periferia do bloco enxertado. Não se observam áreas sem indícios de neoformação óssea e o aspecto é de um tecido contínuo. Percebe-se também a presença de osso medular na interface. As fileiras de osteoblastos ativos são evidentes e linhas de aposição reversa também são observadas. Neovasos estão presentes.

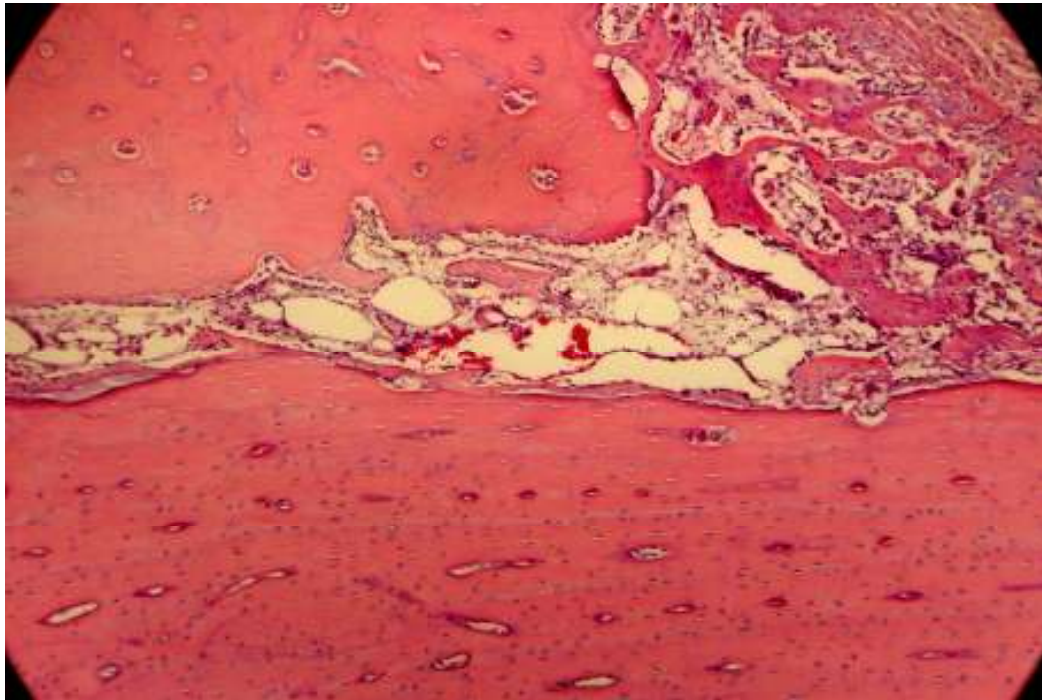


Fig. 54 – Aumento original de 40x. Vista ampliada do ponto A localizado na figura 53.

O trabeculado neoforado mostra osteócitos aprisionados em grande quantidade e fileiras de osteoblastos em atividade. Os plastos ósseos do bloco enxertado e do osso receptor estão preenchidos mostrando viabilidade (Fig. 54).

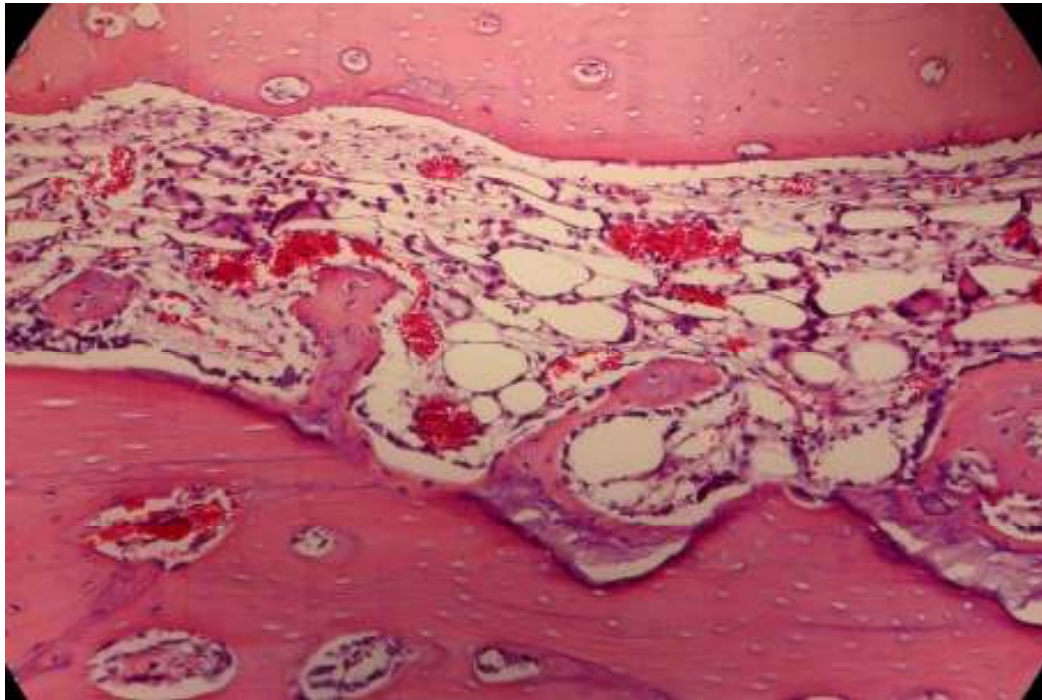


Fig. 55 – Aumento original de 40x. Vista ampliada do ponto B localizado na figura 53.

A imagem mostra neovasos e trabéculas neoformadas partindo do bloco enxertado.

Sacrifício 30 dias – Condição Broca

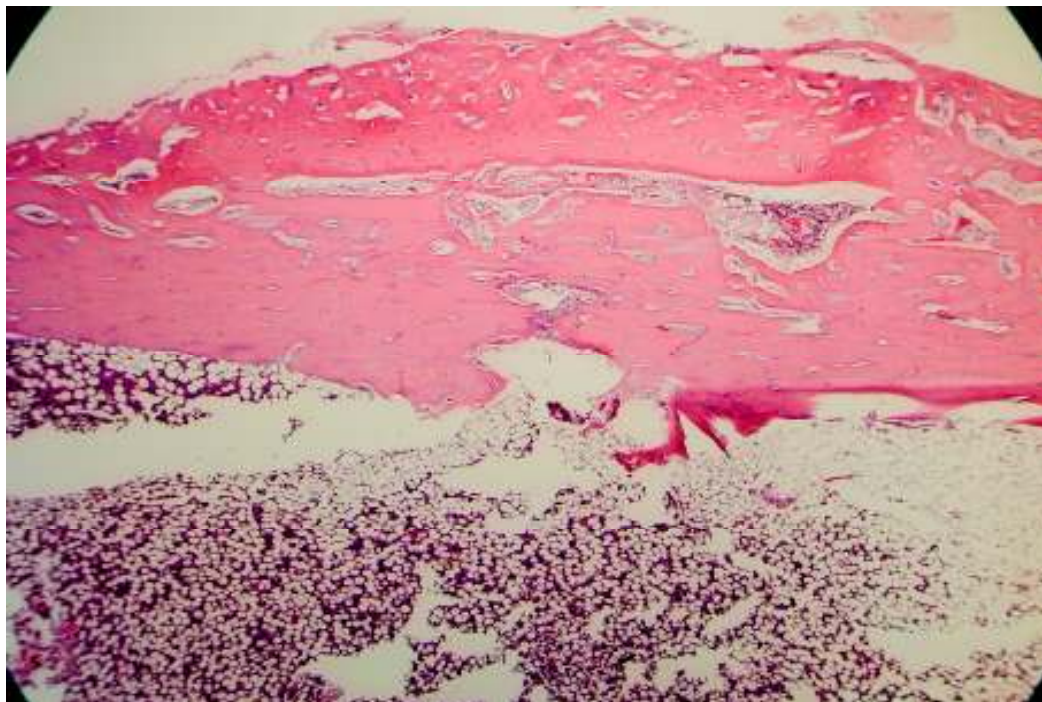


Fig. 56 –Aumento original de 10x. Vista panorâmica do bloco enxertado, interface e leito ósseo receptor.

Com 30 dias observa-se um contorno menos nítido do bloco enxertado e maior quantidade de osso neoformado, principalmente a partir as margens do bloco. A interface começa a perder a nitidez, dando origem a um tecido mais homogêneo. O aspecto do tecido neoformado é mais denso e espaços inter-trabeculares, menos presentes (Fig. 56).

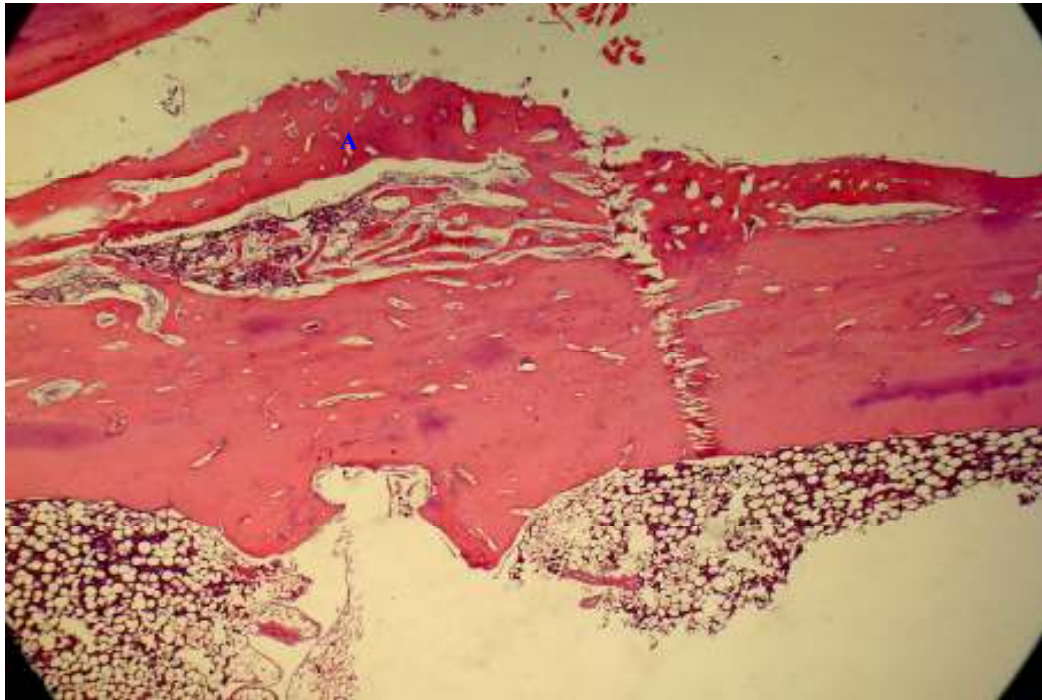


Fig. 57 –Aumento original de 10x. Vista panorâmica do bloco enxertado, interface e leito ósseo receptor.

A imagem corresponde a uma situação análoga a anterior, porém proveniente de outro animal, demonstrando a mesma tendência da anterior apenas guardando uma cicatrização mais lenta, evidenciada pela maior quantidade de espaços inter-trabeculares.

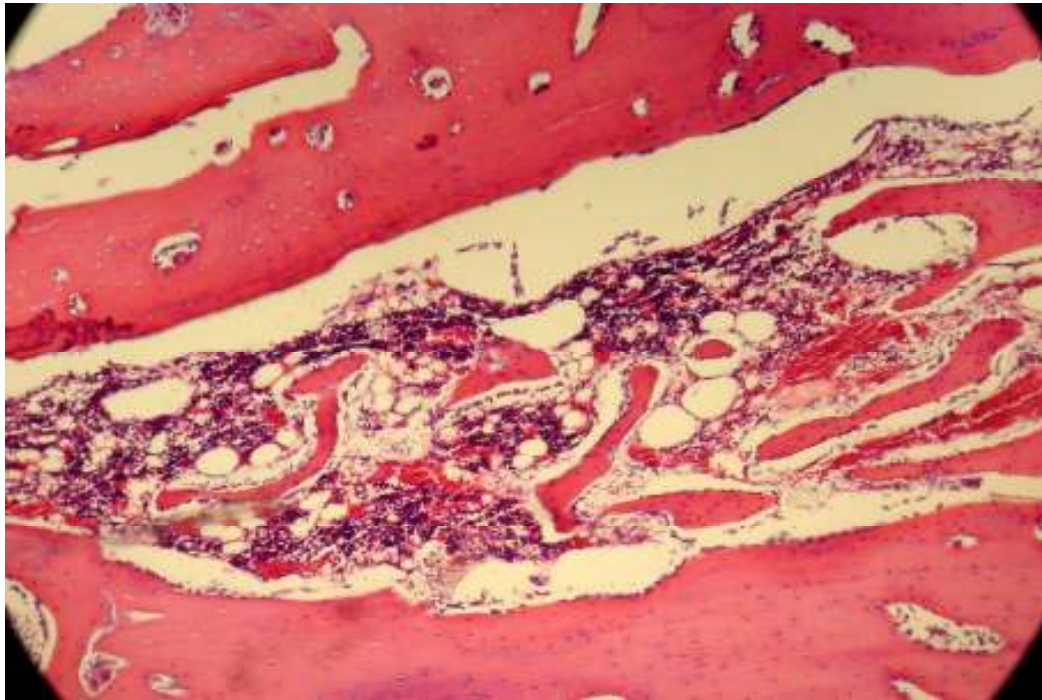


Fig. 58 – Aumento original de 40x. Vista ampliada do ponto A localizado na figura 57.

Trabéculas formadas na interface com atividade neoplásica em quantidades discretas (Fig. 58).

Sacrifício 30 dias – condição *laser*



Fig. 59 – Aumento original de 10x. Vista panorâmica do bloco enxertado, interface e leito ósseo receptor.

Assim como na condição broca, o bloco enxertado perde nitidez de seus limites às custas do osso neoformado. A densidade do novo tecido apresenta-se mais consistente do que na condição 15 dias. O aspecto sugere osso maduro.(círculo),(Fig. 59).

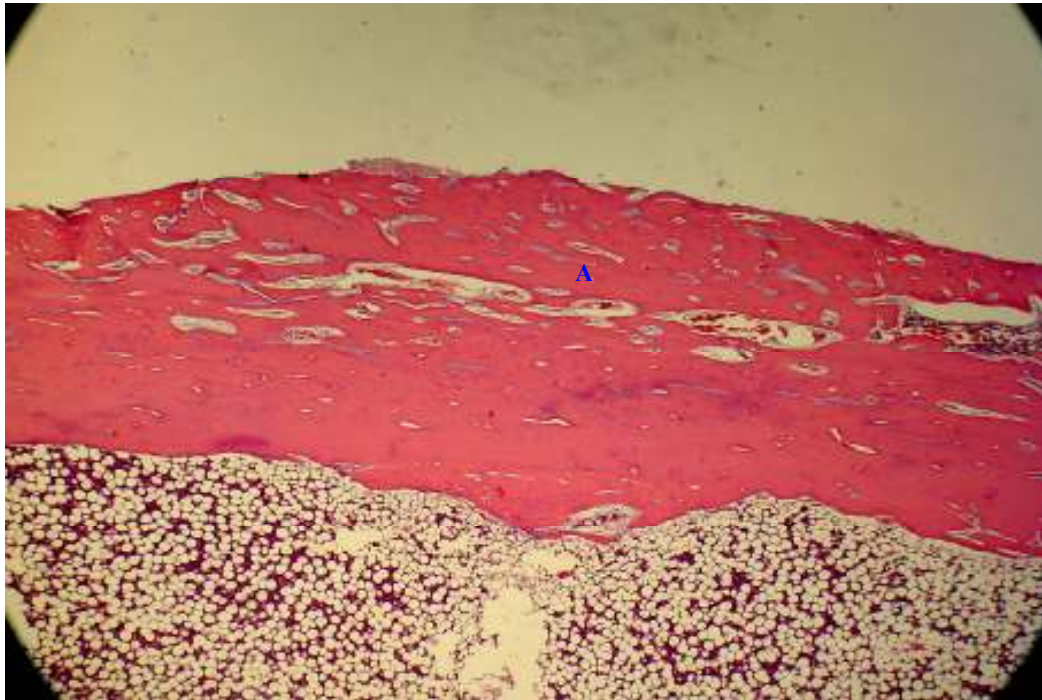


Fig. 60 – Aumento original de 10x. Vista panorâmica do bloco enxertado, interface e leito ósseo receptor.

Em condição análoga, mas em outro animal a situação se repete, com a perda de nitidez do bloco e extensa quantidade de tecido neoformado.(Fig. 60).

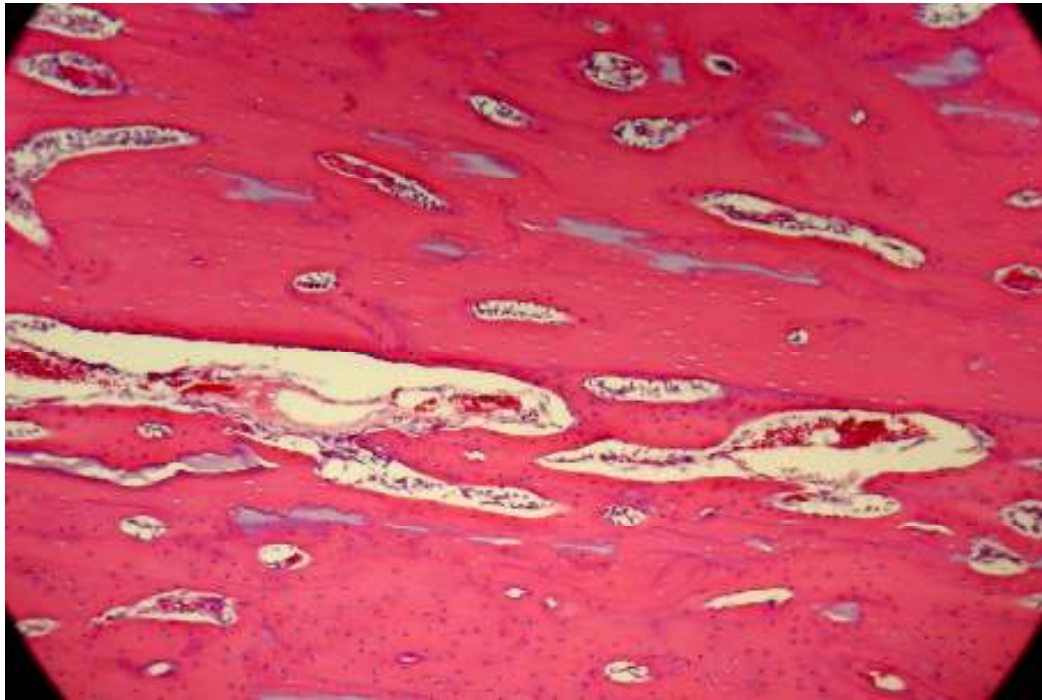


Fig. 61 – Aumento original de 40x. Vista ampliada do ponto A localizado na figura 60.

As linhas de aposição reversa marcam o início do tecido neoforado na interface. É nítido o maior número de osteócitos no osso neoforado. (Fig. 61).

Sacrifício 45 dias – Condição: Broca

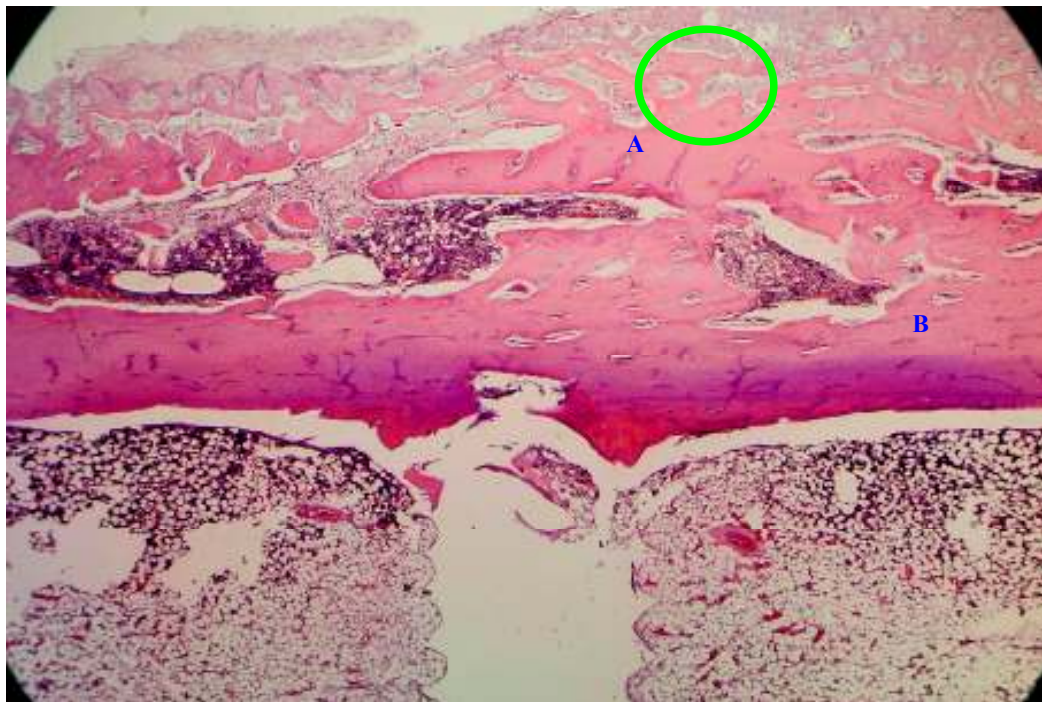


Fig. 62 –Aumento original de 10x. Vista panorâmica do bloco enxertado, interface e leito ósseo receptor.

Não é possível, na figura 62, determinar os contornos do enxerto. Uma área central preenchida por tecido não mineralizado ainda está presente e uma intensa remodelação (círculo) pode ser vista na região do bloco enxertado .

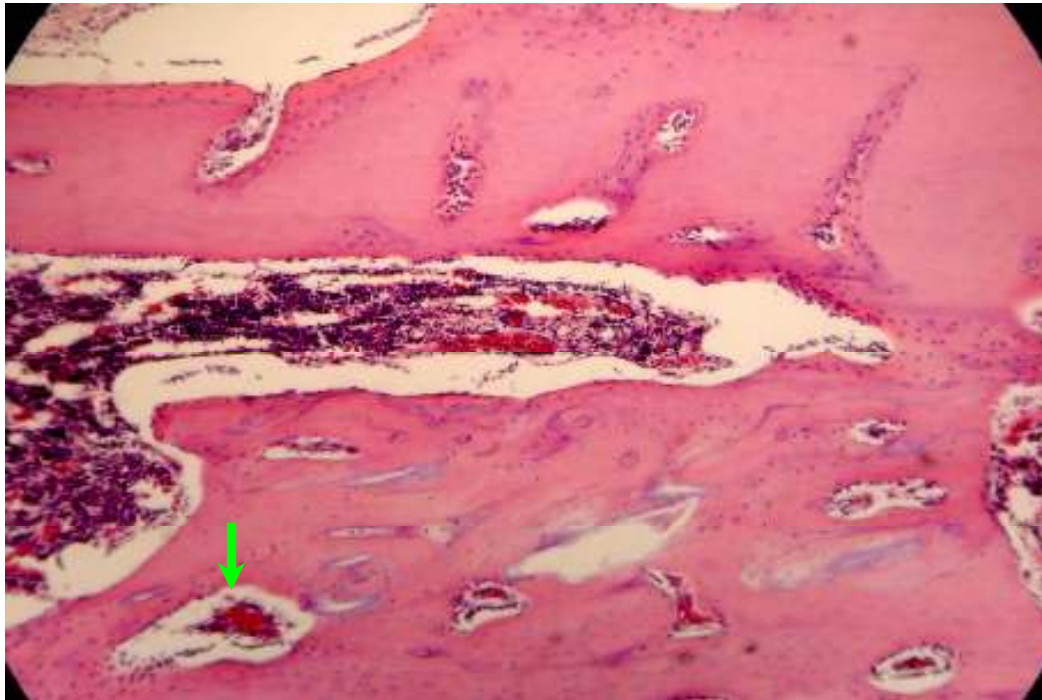


Fig. 63 – Aumento original de 40x. Vista ampliada do ponto A localizado na figura 62.

A atividade osteoblástica ainda está evidente e novos vasos calibrosos (seta) encontram-se no interior do tecido ósseo. Percebe-se a presença de infiltrado inflamatório na área da interface pode ser notado.(Fig. 63)

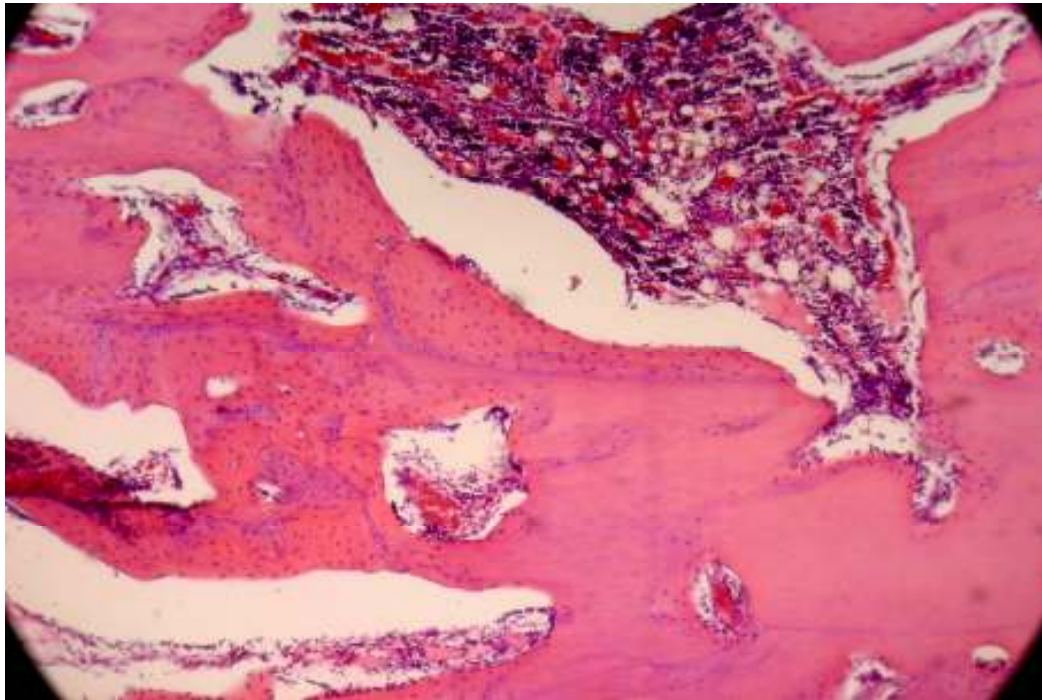


Fig. 64 – Aumento original de 40x. Vista ampliada do ponto B localizado na figura 62.

Na figura 64, o osso neoforado marcado pelo maior número de osteócitos e as linhas de aposição reversa estão bem destacadas evidenciando a atividade formadora. As linhas de osteoblastos ativos sinalizam que ainda existe atividade osteogênica.

Sacrifício 45 dias – Condição: *Laser*

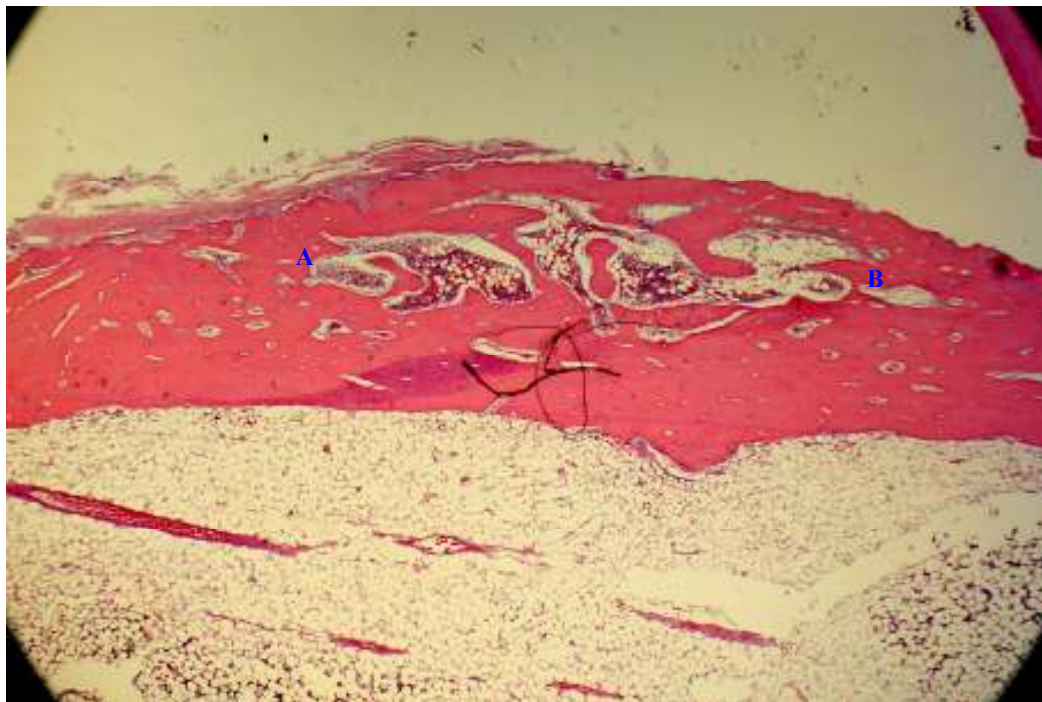


Fig. 65 – Aumento original de 10x. Vista panorâmica do bloco enxertado, interface e leito ósseo receptor.

Semelhante á condição broca, não há como determinar com precisão os limites do bloco enxertado. Áreas contendo infiltrado inflamatório estão presentes sugerindo remodelação óssea.(Fig. 65)

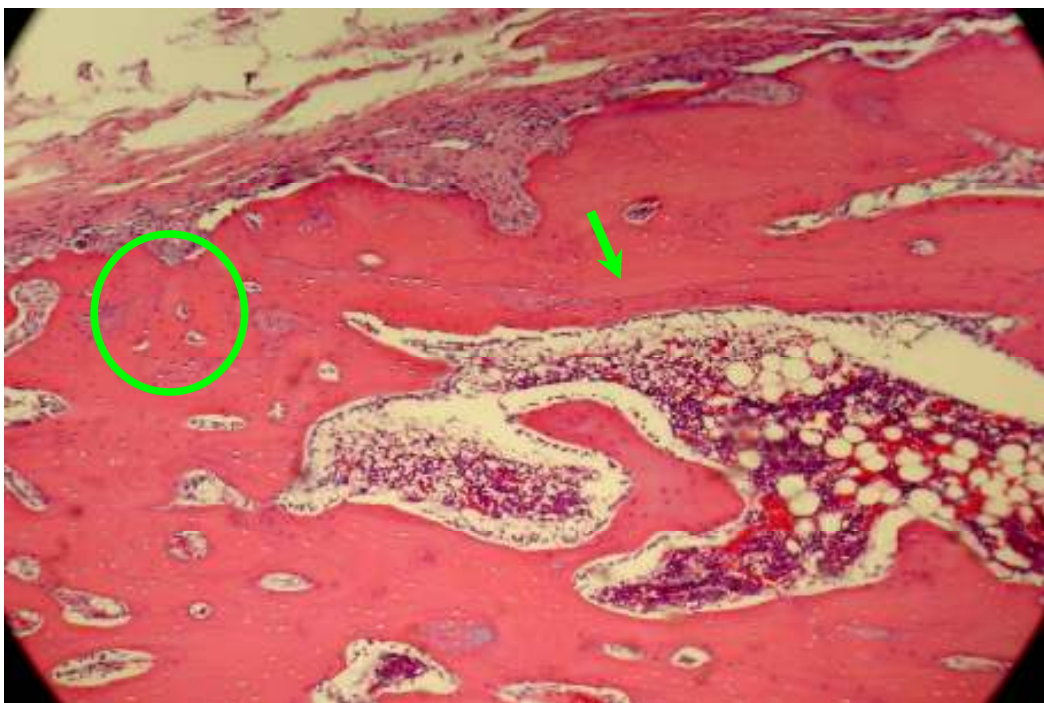


Fig. 66 – Aumento original de 40x. Vista ampliada do ponto A localizado na figura 65.

Presença de novos vasos no interior do tecido, linhas de aposição reversa bem marcadas (seta) e tecido com maior quantidade de osteócitos aprisionados (círculo) revelam o osso neoformado.(Fig. 66).

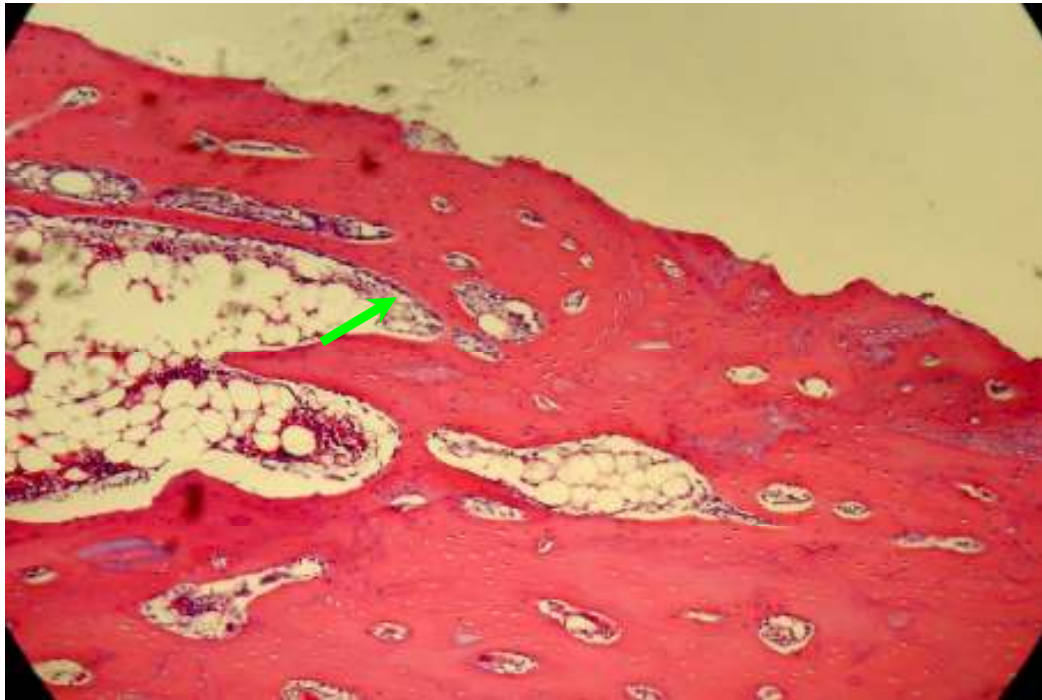


Fig. 67 – Aumento original de 40x. Vista ampliada do ponto B localizado na figura 65.

Na figura 67, as fileiras de osteoblastos ativos (seta) indicam a presença de atividade osteogênica.

5. DISCUSSÃO

Após a realização do experimento, algumas ponderações podem ser feitas com segurança baseadas nas constatações provenientes da técnica cirúrgica e das análises sobre microscopia eletrônica de varredura – MEV, e microscopia óptica.

No aspecto clínico observa-se menor tempo cirúrgico, associado ao uso do *laser* para a confecção do enxerto, provavelmente pelo fato de não haver a necessidade de alternância de equipamentos durante o ato cirúrgico. Uma vez que todo o procedimento é facilmente executado com uma ponta G6, a agilidade na evolução do procedimento fica evidente, tornando o processo mais rápido em relação à broca, uma vez que na técnica convencional, são utilizadas brocas diferentes para cada etapa do procedimento. Essa interrupção do ato cirúrgico e desvio do foco da área operada para os equipamentos associados à necessidade de substituição das brocas, apesar de se fazer em breves momentos, forma um pequeno hiato na continuidade do mesmo.

Observando o aspecto das osteotomias, outra constatação é de que a regularidade da forma dos cortes é mais evidente no método que utiliza o *laser* de Er,Cr:YSGG, do que no método convencional, por brocas 701. Isso se deve ao fato do *laser* não exercer contato físico/mecânico com o tecido operado, não gerando tendências de trajetórias determinadas por maior ou menor atrito do tecido. Ainda, as brocas são instrumentos rotatórios e mesmo muito equilibradas desenvolvem certa tendência a trajetórias específicas, em função do atrito com o tecido ósseo. Essa

trajetória deve constantemente ser compensada pela firmeza do pulso do cirurgião, o que nem sempre determina uma ostetotomia satisfatoriamente retilínea. Fatos esses observados nas osteotomias do experimento.

Quanto à operacionalização da técnica de enxerto, salientamos que ela é muito bem aceita e largamente empregada através do uso de brocas, sendo essa a metodologia de eleição para os procedimentos de enxertos ósseos maxilares.

Quando utilizamos o *laser* de Er,Cr: YSGG, observamos ser também um procedimento perfeitamente viável, até mesmo pelas conhecidas propriedades desse comprimento de onda em relação à sua interação com os tecidos biológicos.

Uma diferença que ainda deve ser melhor investigada está na necessidade de utilização de spray ar/água, pelo equipamento *laser*. Esse spray é desnecessário quando se trata do uso de brocas montadas em motores cirúrgicos elétricos, pois nesses casos o resfriamento se dá através de bombas peristálticas, que impulsionam a solução irrigadora através de um circuito fechado e puro, ou seja sem a necessidade de adição de ar.

O ar misturado a substância irrigadora e levados até o sítio cirúrgico pelo equipamento *laser* são fundamentais para a retirada de calor do local onde a ablação está ocorrendo ativamente, não transmitindo calor excessivo aos tecidos biológicos irradiados. Entretanto, nos parâmetros utilizados em nosso estudo verificamos que há uma tendência ao dano de estruturas ósseas medulares, quando o *laser* irradia uma mesma posição, como é o caso da perfuração central do bloco à ser enxertado para a passagem do parafuso de fixação. Isso se dá pelo uso

contínuo do *laser* e conseqüentemente do spray, num mesmo local por um tempo estendido. Preocupação adicional é tomada com a possibilidade de introdução desse spray no interior dos tecidos, causando possíveis efizemas. Essa situação não ocorreu em nosso experimento, e acreditamos ser uma questão muito mais direcionada a adequação da técnica e dos parâmetros, à tecnologia *laser*, do que necessariamente uma restrição de uso.

O aspecto clínico pós-operatório foi similar nas duas condições, apesar de não ser esse um critério de observação de nosso estudo.

Sob as análises microscópicas, constatamos que as imagens resultantes da MEV nos mostram uma tendência à uma cicatrização mais efetiva nos primeiros dias, na condição *laser*, quando comparada à condição broca. A tendência à um arredondamento mais precoce do enxerto e a neoformação óssea mais evidente na interface, observadas na condição *laser* para sacrifícios de 15 e 30 dias, nos sugere um processo de cicatrização mais adiantado, para essa condição, uma vez que esses parâmetros são observados nas fases iniciais do reparo ósseo, e são determinados pela remodelação óssea inicial ocorrida pelo trauma cirúrgico e posteriormente pela neoformação de tecido ósseo entre as faces que compõem a intimidade osso / enxerto.

Na avaliação histológica sob microscopia óptica, decorridos 15 dias do procedimento cirúrgico, observamos atividade osteoblástica intensa, mais evidente na periferia do bloco enxertado, e com sinais de uma organização maior na condição broca. Entretanto a condição *laser* mostra uma interface mais preenchida por tecido

tecido neo formador. Na condição broca grandes espaços vazios são encontrados na interface, principalmente na porção mais central.

Em ambas as condições não há sinais de necrose e o aspecto do bloco enxertado encontra-se viável, com os plastos preenchidos pelos osteócitos.

Com 30 dias decorridos do ato cirúrgico, o osso da interface apresenta um aspecto mais maduro embora na condição broca a quantidade de trabéculas ósseas presentes na porção central da interface seja mais discreta do que na condição *laser*. A remodelação óssea encontra-se em andamento, ficando clara a mudança de contorno do bloco ósseo, com arredondamento dos ângulos do enxerto.

A presença mais nítida de espaços vazios na condição broca, mostra uma tendência à uma fase inflamatória mais duradoura, onde a preocupação com o organismo ainda se concentra na limpeza do sítio operado, antes de ingressar na fase proliferativa celular, propriamente dita. Na fase proliferativa é onde observa-se a formação de novo tecido, fato que ficou mais evidente na condição *laser*, acentuando-se para o período de sacrifício de 30 dias.

Com 45 dias de evolução, não foram observadas diferenças qualitativas significativas entre as condições estudadas, apontando para uma cicatrização praticamente completa e uma excelente integração entre osso/enxerto em ambas as condições sob a luz da MEV. Isso nos induz a pensar em uma equiparação dos processos regenerativos na fase mais tardia do reparo, o que seria coerente com a literatura^{12,13}, uma vez que tanto com o uso do *laser* ou da broca, o reparo ósseo apresenta condições adequadas para se estabelecer.

Os cortes histológicos mostraram áreas de remodelação óssea com fileiras de osteoblastos ativos e algum tecido inflamatório no interior do novo osso, não necessariamente localizados na interface. Esse aspecto pode sugerir um processo de substituição, onde o osso originalmente enxertado seja aos poucos trocado por um osso totalmente novo, e não apenas haja uma neoformação na interface. Essa proposição é encontrada na literatura^{10,17}.

6. CONCLUSÕES

Nas condições desse estudo foi possível concluir que:

- Foi possível a execução de enxertos ósseos em bloco com a utilização integral do *laser* Er,Cr:YSGG;
- Clinicamente houve maior regularidade das osteotomias, utilizando o *laser* Er,Cr:YSGG, do que a broca 701;
- Numa fase inicial, a cicatrização da interface osso/enxerto se mostrou mais homogênea na condição *laser* Er,Cr:YSGG, quando comparada à técnica convencional com brocas 701;
- Na fase final do período de reparação estudado (45 dias), não houve diferença qualitativa entre a cicatrização da interface osso/enxerto, quando comparada as condições *laser* Er,Cr:YSGG e brocas, indicando que o *laser* Er,Cr:YSGG é um potencial candidato para a realização de enxertos autógenos *in vivo*;

Novos parâmetros de energia e de calibração do spray ar/água devem ser investigados para a determinação da condição ideal de irradiação com *laser* Er,Cr:YSGG, para as cirurgias de enxertos ósseos em bloco, assim como nova metodologia quantitativa, com o uso de marcadores celulares e novos prazos de sacrifício devem ser empregados para precisar as fases do reparo em cada condição. A análise da área doadora também deve ser investigada uma vez que a ação do *laser* na retirada do enxerto pode trazer diferenças no padrão cicatricial.

• 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARUN, K. G. **Prática na Implantodontia**. 1.ed. São Paulo, S.P., Editorial Premier, 2001.
2. BORNESTEIN, E.S.; LOMKE, M. A. The safety and effectiveness of dental Er: YAG *lasers*. A Literature review with specific reference to bone. **Dentistry Today**, v.20, p. 129-133, 2003.
3. CIFUENTES C. *Laser: una herramienta de trabajo para la odontología*. **Revista Mundo Dental 2005** Chile. Disponível em <http://www.omnidental.com.ar/publicaciones.htm>> Acesso em 07 jun. 2006.
4. EL MONTASER, M. A. e al. Pattern of healing of clavial bone in the rat following application of the Er: Yag *laser*. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 21, n. 3, p. 255-261, 1997.
5. EVERSOLE LR, RIZOIU IM. Preliminary investigations on the utility of an erbium, chromium YSGG *laser*. **J Calif Dent Assoc** 1995 Dec;23(12):41-7
6. FRIED, D.; ASHOURI, N; BREUNING, T.; SHORI, R. Mechanism of water Augmentation During IR *Laser* Ablation of Dental Enamel. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.31, p. 186-193, 200.
7. HARASHIMA T, KINOSHITA J, KIMURA Y, BRUGNERA A, ZANIN F, PECORA JD, MATSUMOTO K. Morphological comparative study on ablation of dental hard tissues at cavity preparation by Er:YAG and Er,Cr:YSGG *lasers*. **Photomed Laser Surg** 2005 Feb;23(1):52-5.
8. HIBST, R. Mechanical Effects of Erbium:YAG *Laser* Bone Ablation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v12, p.125-130, 1992.
9. JESSE J, DESAI S, OSHITA P. The evolution of *lasers* in dentistry: **ruby to YSGG**. **The Academy of Dental Therapeutics and Stomatology** 2004. Disponível em <<http://www.biolase.com/clinicalarticles>> Acesso em 08 jun. 2006.
10. JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. **Histologia básica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004.
11. KELLER, U.; HIBST, R. Effects of Erbium: Yag *Lasers* Osteotomy. In: **International Society for Lasers in Surgery Congress**, USA, 1992.
12. KIMURA Y, YU DG, FUJITA A, YAMASHITA A, MURAKAMI Y, MATSUMOTO K. Effects of erbium,chromium:YSGG *laser* irradiation on canine mandibular bone. **J Periodontol** 2001 Sep;72(9):1178-82.

13. KURAMOTO, M.; EDUARDO, C.,P.; MATSON, E.; MIADAIRA, E., A.; JAEGER, R., G. Comparative Study by Scanning Electron Microscopy of the Bone Tissue Cutting by Er:YAG *Laser* and Air Turbine Drills. In: **6th International Congress on Lasers in Dentistry**, 1998.
14. LEWANDROWSKI KU et al. Use of the Er:YAG *laser* for improved plating in maxillofacial surgery: comparison of bone healing in *laser* and drill osteotomias. **Lasers Surg Med** 1996;19:40-45.
15. MAJARON, B.; LUKAC, M. Calculation of Crater Shape in Pulsed *Laser* Abaltion of Hard Tissues. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.24, p. 55-60, 1999.
16. MARTINS, G.L., **Estudo microscópico do reparo ósseo na mandíbula de ratos submetida a ostectomias a fresa cirúrgica e laser de Er: YAG**. Porto Alegre, Brasil, 2001.
17. MENEZES, P. D. F., **Análise da reparação óssea de osteotomias realizadas com brocas e com laser de Er,Cr:YSGG, acrescidas ou não de terapia adjunta com laser em baixa intensidade. Estudo histológico em modelo animal**. p.52-55, Santo Amaro, Brasil, 2004.
18. NEVES, J. B. Enxertos ósseos intra-orais em implantodontia. **Atualização Multidisciplinar para o Clínico e o Especialista**. Rio de Janeiro, Brasil, 2003. Medsi. v.3 cap. 14, p.293 – 301. Odontologia Integrada –
19. POURZARADIAN, A.; WATANABE, H.; AOKI, A.; ICHIONESE, S.; SASAKI, K.; NITTA, G.; ISHIKAWA, I. Histological and TEM Examination of Early Stages of Bone Healin after Er: YAG *Laser* Irradiation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.22, p.342 -350, 2004.
20. RAYAN, G. M. et al. Effects of rapid pulsed CO2 *laser* beam on cortical bone, in vivo. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.12, n. 6, p. 615-620, 1992.
21. SASAKI, K.M.; AOKI, A.; ICHISONE, S.; ISHIKAWA, I. Ultraestrutural Analysis of Bone Tissue Irradiated by Er: Yag *Laser*. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.31, p. 322-332, 2002.
22. SEIBERT, J.S. Reconstruction of deformed, partially edentulous ridges, using full thickness onlay grafts. Technique an wound healing. **Compend. Contin. Educ. Dent.** v4, p. 437-453, 1983.
23. SPYROS, A. C.; Er:YAG and CO₂ *Lasers* in Oral Implantology: A Study on 83 Implants. **The Journal of Oral Lasers Applications**. v.3, p.97 – 103, 2003.
24. MATSUYAMA, T.; AOKI, A.; SHIGERU, O.; YONEYAMA, T.; ISHIKAWA, I. **Effects of the Er:YAG Laser Irradiation on Titanium Implant Materials and Contaminated Implants Abutmen Surfaces**. Journal of Clinical *Laser* Medicine & Surgery. v.21, p.7-17, 2003.

25. WANG X, ZHANG C, Matsumoto K. In vivo study of the healing processes that occur in the jaws of rabbits following perforation by an Er,Cr:YSGG *laser*. **Lasers Med Sci** 2005;20(1):21-7.
26. WANG X, ISHIZAKI NT, SUZUKI N, KIMURA Y, MATSUMOTO K. Morphological changes of bovine mandibular bone irradiated by Er,Cr:YSGG *laser*: an in vitro study. **J Clin Laser Med Surg** 2002 Oct;20(5):245-50.
27. WATERLASE YSGG™. Hard and Soft Tissue *Laser*. **User Manual**. USA, 2003
28. ZECELL, D.M. ; MALDONADO, E. P.; RIBEIRO, M. S. Interação da Luz *Laser* com Tecidos Biológicos. In: MATERIAL DIDÁTICO DO MESTRADO PROFISSIONALIZANTE "**Lasers em Odontologia**". IPEN & FOU SP, São Paulo, 2004.