

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

**EFEITOS DO *LASER* EM BAIXA INTENSIDADE EM ENXERTOS DE TECIDO
ÓSSEO ALÓGENOS PARTICULADOS EM FÊMURES DE COELHOS**

CLAUDIR GIANNETTO

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

**Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Zezell
Coorientadora: Profa. Dra. Sheila Cynthia Gouw**

**São Paulo-SP
2011**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que, embora ausentes nesta etapa da minha vida, muito contribuíram para minha formação profissional, por seus exemplos de dedicação e amor, que foram a base de tudo, mesmo diante de todas as dificuldades que passaram para educar os filhos, oferecendo-lhes sempre o melhor.

Aos meus filhos, razão da minha vida, ofereço-lhes hoje tudo que tenho realizado de bom na vida, exemplo disso é este trabalho que acabo de concluir.

Deixo um poema que representa muito dos ensinamentos aprendidos com vocês.

Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja aquilo que você quer ser,
Porque você possui apenas uma vida
E nela só se tem uma chance,
de fazer aquilo que quer.
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
e esperança suficiente para fazê-la feliz.
As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que
aparecem em seus caminhos.
A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
e para aqueles que reconhecem a importância das
pessoas que passam por suas vidas.

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e inspiração para a realização deste trabalho, e mande-me Vosso Espírito Santo, Ele sabe melhor do que eu tudo de que preciso.

A minha família pelo convívio, apoio, incentivo e pela amizade.

À Dra. Denise Maria Zezell, orientadora deste trabalho, que sempre esteve ao meu lado disponibilizando seu tempo e conhecimentos que muito me ajudaram para a conclusão desta dissertação.

À Dra. Sheila Gouw, coorientadora deste trabalho, pela ajuda por meio das correções e orientações.

À Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli, professora titular do Departamento de Patologia da Faculdade Veterinária da Universidade de São Paulo, pela cessão do seu Laboratório de Oncologia Experimental, sem a qual não teria sido possível fazer as leituras histológicas.

Ao meu querido filho e colega Eduardo Giannetto, pela ajuda na parte experimental cirúrgica desenvolvida no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao meu filho e colega Leandro Giannetto, pela ajuda na fase de captação dos tecidos para preparo histotécnico das lâminas.

À minha filha Adriane Giannetto, pela ajuda na tradução de alguns textos da língua inglesa.

À minha filha Luciana Giannetto, pelo apoio, interesse e carinho.

Ao meu sobrinho Dr. Alexandre Cappelozza, pelas análises estatísticas feitas para este experimento.

Aos funcionários da Clínica Giannetto, pela paciência, ajuda e compreensão, com especial agradecimento a Léia Maria Leão de Souza pela ajuda nas cirurgias do experimento realizadas no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

À equipe de professores, estagiários e funcionários do IPEN e do LELO, pela paciência, ensinamentos, respeito e direcionamento profissional.

Ao Dr. Eduardo Pompeu, médico veterinário responsável pelo Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela ajuda, colaboração e presteza.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela atenção, ajuda e colaboração nos cuidados com os animais.

Ao Banco de Tecidos do IOT-FMUSP, pela cessão do centro cirúrgico do biotério onde foram feitas as captações, o processamento e a criopreservação dos tecidos para posterior uso na fase experimental.

Ao Dr. Luis Augusto Ubirajara dos Santos, responsável técnico pelo Banco de Tecidos do IOT-FMUSP, pelo apoio e incentivo ao meu experimento, desde o primeiro contato feito, mesmo quando o projeto era apenas uma ideia.

Aos funcionários do Banco de Tecidos do IOT-FMUSP, pela ajuda na captação, no processamento e na criopresevação dos tecidos, com especial atenção a Lucas da Silva Custódio Pereira e Julio César de Oliveira Shinzato.

À Teresa Cristina Souto Maior, bibliotecária do I.C.B da USP, pela atenção e disponibilidade em ajudar em muitos momentos na minha vida profissional que se estenderam até a conclusão deste trabalho.

À Dentoflex, pelo apoio e pela confiabilidade no meu trabalho, com atenção aos diretores Dr. Jorge Mulatinho e Dr. Gilberto Moscardo.

Aos meus colegas de mestrado com os quais tive o prazer de conviver, aprender, e dividir momentos de ansiedade, apreensão e muitas alegrias.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram nesta fase da minha vida profissional para a realização deste trabalho.

EFEITOS DO *LASER* EM BAIXA INTENSIDADE EM ENXERTOS DE TECIDO ÓSSEO ALÓGENOS PARTICULADOS EM FÊMURES DE COELHOS

Claudir Giannetto

RESUMO

Este estudo pretendeu avaliar os efeitos da irradiação do *laser* em baixa intensidade em perfurações ósseas realizadas em fêmures de coelhos e preenchidas com enxerto ósseo alógeno particulado proveniente de outros três coelhos que foram os doadores de tecidos. Foram utilizados trinta e três coelhos divididos em três grupos de onze animais, os quais receberam dois enxertos, um em cada fêmur, um dos quais foi irradiado, enquanto o outro representou o seu próprio controle. Após cirurgias para a captação e o processamento dos tecidos, estes foram conservados a -80 °C até o seu uso no experimento. Durante as cirurgias, os fêmures direito e esquerdo receberam os enxertos ósseos particulados que foram irradiados aleatoriamente. A irradiação *laser* com 7,5 J/cm² ocorreu no leito receptor em um dos fêmures dos coelhos imediatamente após o seu preparo, previamente à colocação do tecido ósseo particulado que representou o nosso enxerto. Em seguida, após a sua colocação no alvéolo, ou seja, após o preenchimento da loja cirúrgica, este foi novamente irradiado. Os cortes histológicos dos locais irradiados com *laser* de baixa potência durante o processo de reparação tecidual óssea foram confrontados com os resultados histológicos dos locais não irradiados. A avaliação dos efeitos da irradiação *laser* na regeneração do tecido ósseo indica que houve aceleração neste processo, nos momentos estudados: 20 e 30 dias após a irradiação, juntamente com uma melhor qualidade e quantidade de tecido ósseo. Os resultados indicam a possibilidade de uso clínico do protocolo proposto neste trabalho.

LOW INTENSITY *LASER* EFFECTS IN PARTICULATE ALLOGRAFT BONE IN RABBITS FEMURS

Claudir Giannetto

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of low intensity *laser* irradiation in bone drilling carried out in rabbits femurs and filled with allograft bone from other three rabbits that were tissue donors. For this study, a selection of thirty-three rabbits were divided into three groups of eleven animals. Each animal received two grafts in each femur, one suffered irradiation and the other one represented their own control. 3 animal were surgieried for tissue collection and processing, the tissues were stored at – 80 °C (-112° F). The other 33 rabbits had the right and left femurs receiving the bone graft particles. The irradiation procedure was performed with 7,5 J/cm² in one of the rabbits femur, while the animal was in the receptor bed, just after preparation and before the placement of the particulate bone graft. Then, just after the filling of the surgical cavity, it was irradiated again. The histological slices from irradiated tissues were compared with the non-irradiated regarding the healing process. The low intensity *laser* irradiation on bone resulted in an acceleration of the bone repair compared with non-irradiated histological sites, in the studied periods: 20 and 30 days. Besides that, a better bone quality and quantity of bone tissue were obtained. The results indicate the possibility of using the proposed protocol of this work clinically.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	-	Área
Al	-	Alumínio
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ar	-	Argônio
As	-	Arsênio
BFMUSP	-	Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
BIOTFMUSP	-	Biotério do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
BMU	-	Unidade celular básica
BMPs	-	Proteínas morfogenéticas
BTME	-	Banco de Tecidos Músculoesqueléticos
°C:	-	Graus Celsius
CFO	-	Conselho Federal de Odontologia
CIHDOTs	-	Comissão intra-hospitalar de doadores falecidos
cm	-	Centímetro
cm ²	-	Centímetro ao quadrado
CNCDOs	-	Centrais de notificação e captação de órgãos
CRO	-	Conselho Regional de Odontologia
D	-	Densidade de energia, densidade de energia ou fluência
DBM	-	Matriz óssea desmineralizada
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
E	-	Energia
Ga	-	Gálio
GaAIAs	-	Arseneto de gálio e alumínio
GaAs	-	Arseneto de gálio
HBV	-	Vírus da hepatite B
HCV	-	Vírus da hepatite C
He	-	Hélio

He-Ne	-	Hélio e neônio
HILT:	-	<i>High Intensity Laser Treatment</i>
HIV	-	Síndrome da imunodeficiência
F	-	Frequência ou taxa de repetição
λ	-	Comprimento de onda
FMUSP	-	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FOUSP	-	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FMVZUSP	-	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
I	-	Intensidade
I.C.B	-	Instituto de Ciências Biomédicas
IGF B	-	Fator de crescimento de transformação beta
IGF	-	Fator de crescimento derivado da insulina
IGF-I	-	Fator de crescimento similar a insulina
IPEN	-	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IV	-	Infravermelho
J	-	Joule
<i>LASER</i>	-	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LILT:	-	<i>Low Intensity Laser Therapy</i>
MDAF	-	Fator de angiogênese derivado dos macrófagos
MDFGF	-	Fator de crescimento derivado dos macrófagos
mJ	-	miliJoule
NAT	-	Nucleid Acid Amplification
Ncm	-	Newton x centímetro
Ne	-	Neônio
nm	-	nanômetro
O	-	Oxigênio
OPOs	-	Organização de procura de órgãos
P	-	Potência
PDGF	-	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	-	Potencial hidrogeniônico

RNA	-	Ácido ribonucleico
RNAm	-	Ácido ribonucleico mensageiro
S	-	segundo
SNT-MS	-	Sistema Nacional de Transplantes-Ministério da Saúde
T	-	Tempo
TGF-Beta	-	Fator de crescimento de transformação Betas I-II-III
USP	-	Universidade de São Paulo
W	-	Watt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS DA PESQUISA.....	13
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3.1 TECIDO ÓSSEO.....	17
3.2 HISTOLOGIA ÓSSEA GERAL	17
3.2.1 Células ósseas.....	20
3.3 MINERALIZAÇÃO	24
3.4 ENXERTOS ÓSSEOS	26
3.4.1 Osteogênese na enxertia óssea	27
3.4.2 Enxertos autógenos	29
3.4.3 Enxertos alógenos	31
3.4.4 Enxertos xenógenos	39
3.5 BANCO DE TECIDOS.....	40
3.5.1 Captação dos tecidos.....	41
3.6 EFEITOS DO <i>LASER</i> DE BAIXA INTENSIDADE NA REPARAÇÃO ÓSSEA.....	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1 MATERIAL	53
4.1.1 <i>Laser</i>	54
4.1.2 Caracterização das amostras.....	54
4.1.3. Eutanásia dos animais.....	65
4.1.4 Procedimento histotécnico para confecção das lâminas	66
5. RESULTADOS	666
6. DISCUSSÃO	728
7. CONCLUSÕES.....	84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	866

1 INTRODUÇÃO

A redução da arquitetura óssea é um dos aspectos complicadores na reabilitação de pacientes com implantes dentários, pois a perda dos elementos dentais provoca a atrofia do processo alveolar, o que pode diminuir a estrutura óssea disponível e impossibilitar a colocação de implantes, sendo então muitas vezes necessária a cirurgia prévia de enxerto ósseo.

Para esta cirurgia, classicamente é utilizado osso autógeno, porém, devido à morbidade do pós-operatório na área doadora, tem-se pesquisado alternativas e uma delas consiste no uso de osso humano congelado, proveniente de outro indivíduo porém da mesma espécie, chamado enxerto alógeno, e que dá ao paciente melhores condições pós-operatórias, uma vez que diminui a morbidade do ato cirúrgico, haja vista as propriedades semelhantes às do osso autógeno^{1 2 3 4 5}.

O presente trabalho avalia a influência da irradiação com *laser* de baixa intensidade na região do infravermelho próximo, no processo de reparação dos enxertos alógenos.

Com o aumento da procura de pacientes que se submetem a implantes dentários, ocorre também uma maior casuística sobre a necessidade de realizarmos cirurgias complementares para ganhos na qualidade e quantidade de tecido ósseo, o que favorece a reabilitação oral por meio de implantes dentários.

Estas cirurgias se traduzem muitas vezes na necessidade de enxertos ósseos cuja quantidade de tecido necessário é de pouca monta, o que possibilita a remoção do tecido a ser enxertado do próprio paciente, ou seja, com tecido ósseo proveniente de regiões intrabucais ou regiões extrabucais, dependendo somente da quantidade de tecido a ser enxertado, e que se traduzem como alternativas interessantes para o paciente.

Estes enxertos em que o doador é o próprio receptor são denominados enxertos autógenos, pois o próprio paciente fornece o tecido ósseo a ser transplantado.

Entretanto, quando o paciente necessita de grande quantidade de tecido ósseo para sua reabilitação com uma menor morbidade cirúrgica, necessitamos de tecidos provenientes de outro indivíduo, porém da mesma espécie, chamado tecido ósseo alógeno.

Diante da necessidade de quantidade maior de tecido ósseo, o uso de enxertias com tecidos fornecidos por um banco de tecidos tem sido alvo de pesquisas, e a necessidade de bons resultados se torna uma justificativa na busca de capacitação científica, experimental e clínica na Odontologia.

Partindo de um correto diagnóstico e planejamento das ações, o tratamento cirúrgico quando perfeitamente executado possibilita a obtenção de bons resultados que melhoram a qualidade de vida dos pacientes.

O osso proveniente de banco de tecidos é conservado por crioterapia e o seu uso representa um dado facilitador na obtenção de quantidades significativas de tecido. Evita que o paciente se submeta a duas cirurgias: sendo uma para retirada de tecido ósseo a ser utilizado como enxerto e outra para a colocação destes enxertos.

O objetivo da irradiação do leito receptor e do enxerto, após este ser colocado na respectiva loja cirúrgica, é a obtenção de uma melhor qualidade e quantidade final de tecido ósseo associada a uma aceleração do processo de reparação óssea.

Qualitativamente, a associação entre a irradiação com *laser* de baixa potência no enxerto resulta em um efeito biomodulador positivo com uma melhor organização tecidual e formação precoce de tecido osteoide.

Quantitativamente, a associação entre a irradiação com *laser* de baixa potência e o enxerto resulta em uma maior quantidade de tecido ósseo pela integração do enxerto associado ao tecido já existente, cujo ganho positivo se traduz ao tecido neoformado^{1 2}.

2 OBJETIVOS

O objetivo desta dissertação é avaliar histológica e histomorfometricamente os efeitos da irradiação a *laser* de baixa potência em fêmures de coelhos, submetidos a enxertos ósseos alógenos particulados em alvéolos preparados e que representaram os leitos receptores dos enxertos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A meta ideal da Odontologia Moderna é restaurar o paciente com contorno, função, conforto, estética, fonação e saúde ideais. O cirurgião dentista fornece uma restauração como modo de vida, seja pela remoção de tecido cariado de um dente, seja pela reposição de vários dentes por meio de próteses mucossuportadas, dentossuportadas, dentomucossuportadas ou por próteses implantossuportadas.

Sempre que nos dispomos a restabelecer a função mastigatória por meio de implantes estamos na dependência da quantidade e da qualidade de tecido ósseo.

Perante uma análise preliminar, por meio de exames de inspeção oral e com exames radiográficos complementares, estaremos aptos a planejar a reabilitação do paciente, seja ela com implantes dentários ou não.

Os dentes estão implantados na maxila e na mandíbula dentro de um tecido ósseo chamado osso alveolar, que representa o tecido ósseo que contém, e mantém, os dentes sadios dentro da cavidade oral.

O que torna a implantodontia única é a sua habilidade de atingir essa meta, independentemente da atrofia do tecido ósseo remanescente³.

Quando ocorre a perda de um ou mais elementos dentais dá-se a reabsorção do tecido ósseo alveolar na região desta ausência dental. E por não haver estímulo do órgão dental e do ligamento periodontal, ocorre a perda de tecido ósseo que se agrava ao longo desta ausência; tal situação pode dificultar a reabilitação do paciente e a colocação de implantes como substitutos destes elementos dentais perdidos⁵.

Atwood et al.⁴ (1971) avaliaram as mudanças características no volume ósseo após a perda dentária na região anterior da mandíbula. Foram estabelecidas quatro divisões básicas de osso disponível para o implante na maxila e na mandíbula edêntulas que seguiam fenômenos de absorção natural.

A quantidade de perda óssea que ocorre no primeiro ano, após a perda do elemento dental, é quase 10 vezes maior que nos anos subsequentes⁵.

Tanto na mandíbula quanto na maxila ocorrerão reabsorções ósseas nas regiões onde houve perdas dos elementos dentais; porém, estas reabsorções são diferentes na mandíbula e na maxila. Estes padrões de reabsorções ósseas são classificados de duas formas, segundo a qualidade e a quantidade óssea.

Em 1988, Mich⁶ estabeleceu quatro divisões básicas de qualidade óssea (Figura 1) com base na densidade deste tecido, considerando a relação entre osso compacto e osso medular:

D1 – Osso cortical denso;

D2 – Osso cortical e medular com áreas volumetricamente equilibradas;

D3 – Crista cortical porosa e fina, e osso medula com fino trabeculado;

D4 – Osso cortical quase sem presença na crista, e um trabeculado delgado ocupa quase a totalidade do volume ósseo.

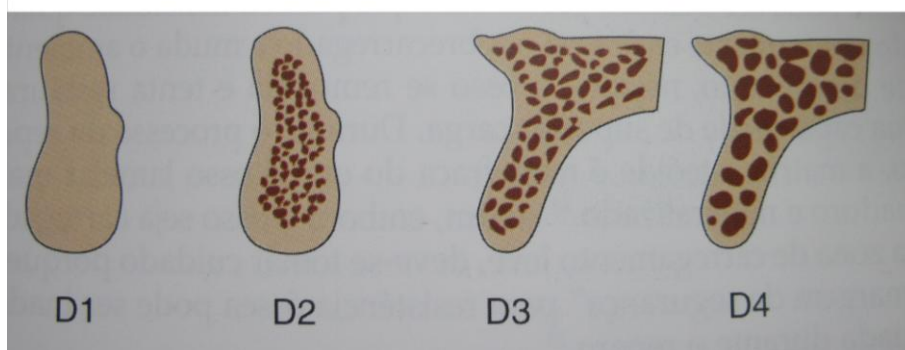


Figura 1 Classificação das densidades ósseas em regiões edêntulas, segundo Mich.

Em 1985, Lekholm e Zarb⁷ classificaram quatro qualidades ósseas para a região dos maxilares (Figura 2) baseados na relação corticomedular do tecido:

Tipo 1 – Crista composta de osso compacto homogêneo;

Tipo 2 – Camada espessa de osso cortical circundando um osso trabecular denso;

Tipo 3 – Camada delgada de osso cortical circundada por osso trabecular denso com boa resistência;

Tipo 4 – Osso cortical e um núcleo de osso trabecular com baixa densidade.

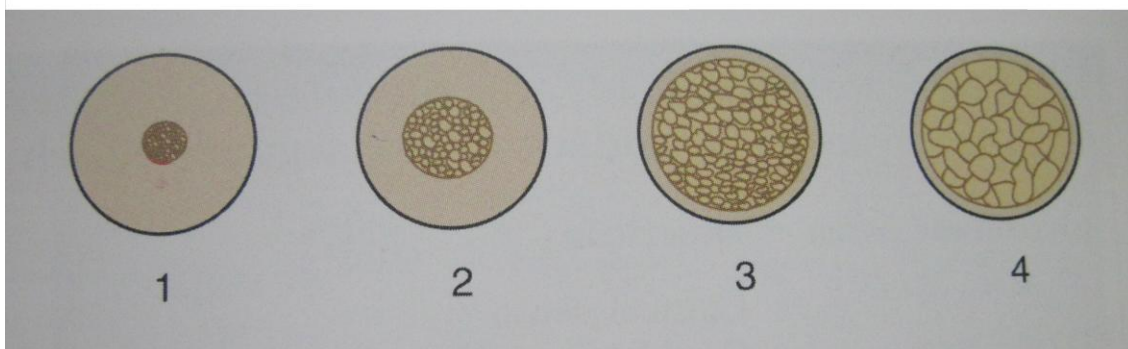


Figura 2 Classificação das densidades ósseas de Lekholm e Zarb

3.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo se apresenta como um tecido conjuntivo, de origem mesenquimatosa, especializado e mineralizado, que se dispõe como uma estrutura rígida e resistente que compõe o esqueleto.

O esqueleto possui funções específicas, entre elas o suporte mecânico do organismo ou apoio para as contrações dos músculos esqueléticos que se transformam em movimentos úteis, além de constituir um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular.

Além disso, o esqueleto protege órgãos contidos na caixa craniana, torácica e no canal raquidiano, entre outros. Aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue.

Além dessas funções, os ossos funcionam como depósitos de cálcio e fósforo e outros íons, armazenando e/ou liberando-os de forma controlada e com a manutenção constante das concentrações desses íons nos líquidos corporais (líquido intersticial, sangue e linfa)⁸.

O tecido mineralizado é formado por 28% de colágeno Tipo I e 5% de proteínas estruturais da matriz como: sialoproteína óssea, osteocalcina, osteonectina, osteopontina e proteoglicanas, fatores de crescimento e algumas proteínas séricas.

A matriz mineralizada é formada por cristais de hidroxiapatita que representam o remanescente ósseo de 67% e são constituídos sob a forma de pequenas placas, sob as quais se alojam, nos espaços e poros das fibrilas colágenas.

3.2 HISTOLOGIA ÓSSEA GERAL

Os ossos são classificados como longos ou chatos com base na sua aparência geral. Os ossos longos incluem os ossos dos membros como tíbia, fêmur, rádio, ulna e úmero. Os ossos chatos incluem todos os ossos do crânio, o esterno, a escápula e a pelve.

Caracteristicamente, todos os ossos apresentam uma densa camada externa de osso compacto e uma cavidade central medular, preenchida por medula

óssea vermelha, ou amarela, e interrompida nas extremidades dos ossos longos por uma malha de trabéculas ósseas, também denominadas osso trabecular ou esponjoso⁹.

Ossos maduros ou adultos, sejam compactos ou trabeculados, são histologicamente idênticos por serem constituídos de camadas ou lamelas microscópicas; são reconhecidos três tipos de lamelas:

1 – Circunferencial: envolve todo osso adulto e forma seu perímetro externo e interno;

2 – Concêntrica: constitui a massa do osso compacto e forma a unidade metabólica básica do osso, chamado ósteon ou sistema harvesiano;

3 – Intersticial.

A osteona é um cilindro de osso e, geralmente, orientado paralelamente ao longo eixo deste. No centro de cada osteona existe um canal chamado canal harvesiano, revestido de uma única camada de células ósseas que recobrem sua superfície, onde se aloja um capilar.

Os canais harvesianos adjacentes são interconectados por canais de volkmann, os quais, semelhantes aos harvesianos, contêm vasos sanguíneos, criando assim uma rica rede vascular através do osso compacto (Figura 3).

As lamelas intersticiais estão interpostas entre camadas concêntricas adjacentes e preenchem os espaços entre elas. Essas lamelas são fragmentos de lamelas concêntricas preexistentes de ósteons criados durante a remodelação, que podem tomar uma grande variedade de formas (Figura 4).

Periosteio

Ao redor da superfície externa de todo osso compacto, existe uma membrana de tecido conjuntivo, o periosteio, que possui duas camadas. A camada externa do periosteio é composta de tecido conjuntivo irregular e denso, denominada camada fibrosa. A camada interna do periosteio, próxima à superfície óssea, é

composta de células ósseas, seus precursores, e de um rico suprimento microvascular.

A superfície interna do osso compacto e do osso esponjoso é coberta pelo endósteo. No entanto, esta camada não é bem demarcada; é composta por tecido conjuntivo frouxo que contém células osteogênicas que separam, fisicamente, a superfície óssea da medula óssea contida no seu interior.

Em geral, a superfície periosteal do osso é mais ativa na formação óssea do que a endosteal¹⁰.

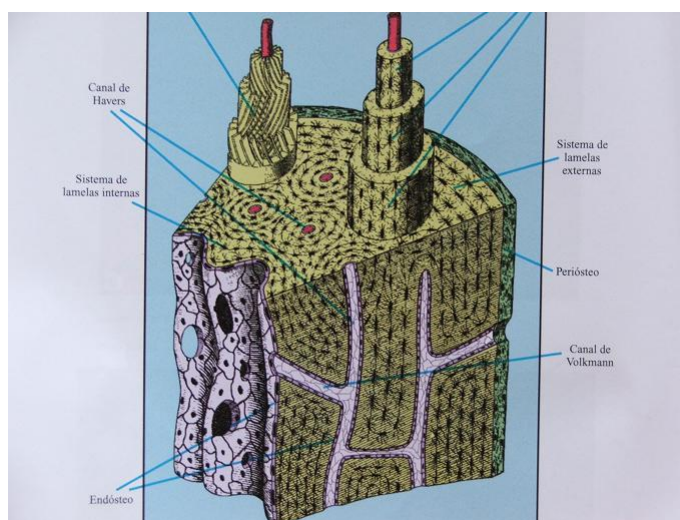


Figura 3 Canais de Havers Wolkmann – Osso Compacto

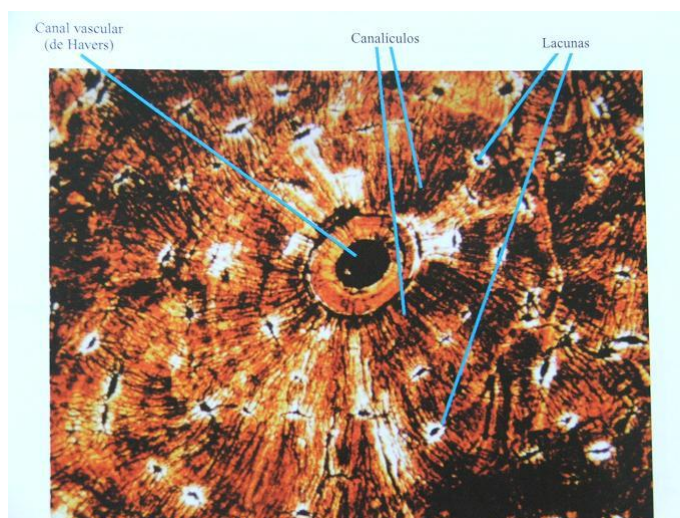


Figura 4 Canais de Havers – Osso Compacto

3.2.1 Células ósseas

Para manter a integridade estrutural do osso, um grande número de células é continuamente recrutado. Interferências nesses mecanismos podem ser responsáveis por várias alterações patológicas do osso, o que torna a origem dessas células de suma importância.

As células formadoras de osso possuem uma origem mesenquimal e são chamadas células-tronco mesenquimais, enquanto os osteoclastos possuem origem hematopoiética. A diferenciação de ambos os tipos celulares é um processo com várias etapas e estimulada por um único grupo de citocinas, fatores de crescimento e hormônios que são parte de um complexo de trajetórias de sinalização.

Diferentes células são responsáveis pela formação, reabsorção e manutenção da arquitetura óssea¹¹.

Dois linhagens de células estão presentes no osso, cada uma com sua função específica: células osteogênicas formam e mantêm o tecido ósseo e os osteoclastos que reabsorvem o osso.

As células osteogênicas possuem uma morfologia variada e incluem as osteoprogenitoras; são também células mesenquimais indiferenciadas.

Pré-osteoblastos, osteoblastos, osteócitos e células de revestimento ósseo representam diversos estágios de maturação¹².

Osteoblastos

Osteoblastos são células mononucleadas que sintetizam proteínas colágenas e não colágenas da matriz óssea.

Alguns destes constituintes primeiro acumulam uma matriz imatura denominada osteoide, composta principalmente de colágeno, a qual age como um arcabouço para a deposição dos cristais de apatita no osso. Os osteoblastos se originam de células-tronco pluripotentes de origem mesenquimal.

Os osteoblastos (Figura 5), assim como os pré-osteoblastos, apresentam níveis elevados de fosfatase alcalina na superfície externa da sua membrana plasmática.

Além das proteínas estruturais da matriz, os osteoblastos, seus precursores, ou ambos, secretam várias citocinas e fatores de crescimento que ajudam a regular a função celular e a formação óssea^{13 14}.

Fatores de crescimento

Estes incluem as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e fatores de crescimento, como:

- 1 – Fator de transformação de crescimento beta;
- 2 – Fatores de crescimento insulino-dependente (IGF-1 e IGF-II);
- 3 – Fator de crescimento derivado de plaquetas;
- 4 – Fator de crescimento fibroblástico.

Embora o tempo de secreção e a complexa interação desses fatores de crescimento não sejam claros, as combinações de IGF-I, fator de transformação de crescimento beta e fator de crescimento derivado de plaquetas aumentam a rapidez de formação óssea e do reparo ósseo e são consideradas para o tratamento de enxertos ósseos.

Os hormônios presentes no metabolismo ósseo são: o paratormônio e a vitamina D, a calcitonina, o estrogênio e os glicocorticoides.

O paratormônio e a vitamina D são bifásicos em suas ações, aumentando a reabsorção óssea em altas concentrações (farmacológicas), mas estimulam a neoformação óssea em baixas concentrações (fisiológicas).

A calcitonina e o estrogênio inibem a reabsorção, enquanto os glicocorticoides inibem tanto a reabsorção quanto principalmente a formação, ficando claro que os hormônios afetam a atividade óssea pela alteração na secreção de citocinas e pelos fatores de crescimento.

Os osteoblastos formam uma camada de células sobre a superfície óssea em formação e atuam como uma barreira que controla o fluxo de entrada e saída de íons no tecido ósseo.

Osteócitos

Os osteoblastos envolvidos pela matriz que eles secretam, seja ela mineralizada ou desmineralizada, passam a ser chamados osteócitos. O número de osteoblastos que se tornam osteócitos varia de acordo com a velocidade do osso: quanto mais rápida a formação, mais osteócitos estão presentes por unidade de volume. Portanto, o osso embrionário e o osso de reparação possuem mais osteócitos que o osso lamelar.

Após a sua formação, os osteócitos reduzem seu tamanho pela baixa atividade celular desta fase e ocupam um espaço na matriz chamado lacuna osteocítica.

Estreitos prolongamentos dessas lacunas formam canais cercados, ou canalículos, que abrigam os prolongamentos irradiados dos osteócitos. Por meio destes canais, os osteócitos mantêm contato com os osteócitos adjacentes e com os osteoblastos da superfície do osso. Esta condição coloca os osteócitos numa posição ideal para perceber alterações bioquímicas e mecânicas e responder a eles, ou transmitir sinais às células envolvidas na remodelação óssea para manter a vitalidade e a integridade óssea.

Falhas em qualquer parte deste sistema resultam em hipermineralização (esclerose) e morte do osso. Este osso sem vitalidade é então reabsorvido e substituído durante o processo de renovação óssea. Embora os osteócitos não tenham o mesmo potencial formador de matriz, eles ainda são capazes de secretar proteínas da matriz¹⁵.

Osteoclastos

Osteoclastos são monócitos fusionados, que histologicamente aparecem como células gigantes multinucleadas. Podendo conter até 50 núcleos são responsáveis pela reabsorção óssea. Apresentam-se como uma célula muito maior que todas as outras do tecido ósseo. Tipicamente, os osteoclastos são encontrados em contato com a superfície óssea e ocupam depressões escavadas, denominadas lacunas de Howship, criadas pela própria célula¹⁶.

Ao microscópio eletrônico de varredura, a superfície óssea reabsorvida mostra que as lacunas de Howship são, frequentemente, depressões rasas com uma forma irregular e refletem a atividade e a mobilidade dos osteoclastos durante a reabsorção ativa.

Os osteoclastos se ligam à superfície adjacente do osso; sua membrana celular emite uma grande quantidade de invaginações que formam uma borda chamada borda franjada. Na periferia desta borda em escova, a membrana citoplasmática está justaposta e forma uma zona clara, ou vedante, que não apenas une a célula à superfície óssea, mas isola o microambiente entre elas e a superfície óssea (Figura 6).

Os eventos ligados à reabsorção óssea ocorrem na seguinte sequência:

- 1 – Fixação dos osteoclastos à superfície mineralizada do osso;
- 2 – Criação de um meio ambiente acidífero selado pela ação da bomba de prótons que desmineraliza o osso e expõe a matriz orgânica;
- 3 – Degradação desta matriz orgânica exposta com seus aminoácidos constituintes pela ação de enzimas liberadas, como fosfatase ácida e catepsina;
- 4 – Apreensão de íons minerais e aminoácidos pela célula.

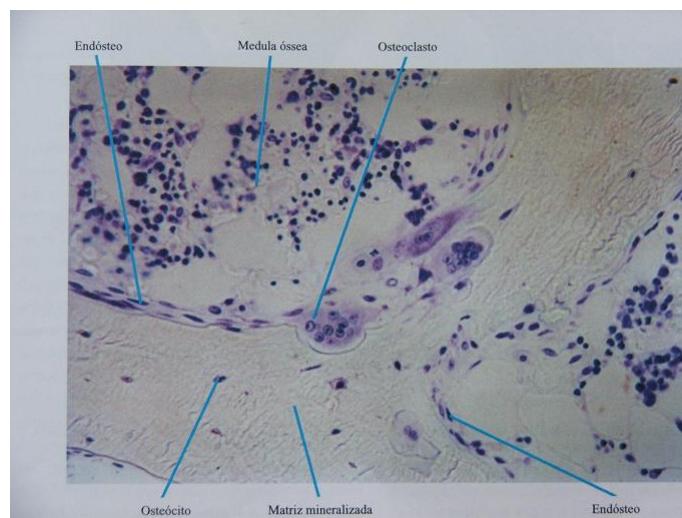


Figura 5 Osso esponjoso ou medular: osteócitos-osteoblastos-osteoclastos

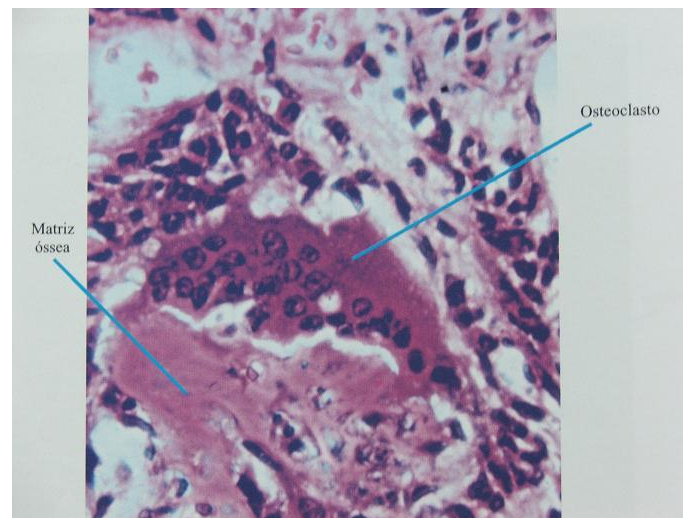


Figura 6 Osteoclastos

3.3 MINERALIZAÇÃO

Uma das condições para que a mineralização ocorra é que o fluido tecidual seja um meio saturado de Ca e de P. Dois mecanismos executam a mineralização do tecido duro: vesícula da matriz e nucleação heterogênea.

Vesícula da matriz

A mineralização inicial de um tecido conjuntivo envolve atividade celular. Após a célula formadora de um tecido mineralizado ter produzido uma quantidade suficiente de matriz orgânica, ela gera pequenas vesículas a partir de sua membrana plasmática para o interior da matriz orgânica extracelular. Estas estruturas limitadas por membranas são denominadas vesículas da matriz.

As vesículas da matriz contêm lipídios que atraem o cálcio e a enzima fosfatase alcalina, onde se formam os primeiros cristais em forma de agulha de hidroxiapatita.

Essas pequenas vesículas que brotam da membrana celular formam uma unidade independente dentro da matriz orgânica e dentro desta vesícula se forma um micromeio ambiente que contém todos os mecanismos à mineralização inicial.

Esse ambiente favorável à formação desses cristalitos contém fosfatase alcalina, pirofosfatase, Ca-ATPase, proteoglicanos. Esses complexos são únicos para determinadas situações durante a mineralização e, quando removidas, impedem a vesícula da matriz de iniciar a mineralização em forma de cristalitos que é chamada de mineralização homogênea. Uma vez formados os cristalitos, a vesícula se torna saturada, rompe-se e fornece condições para o início da segunda fase.

Nucleação heterogênea

Nesta fase, os cristalitos da matriz são depositados em relação às fibras colágenas, ainda que o colágeno não tenha papel algum na sua iniciação. Nas zonas de lacunas das fibras colágenas aparece o primeiro mineral. Inicialmente, essas lacunas estão preenchidas por proteoglicanas, as quais se ligam ao cálcio. Os proteoglicanos são removidos enzimaticamente, deixando para trás o cálcio e, conforme são removidos, fosfoproteínas se unem ao colágeno. A ação da fosfatase alcalina sobre estas fosfoproteínas promove a nucleação e o crescimento dos cristais pelos íons de fosfato adicionados.

Nucleação secundária

Cristalitos adicionais podem ser formados por nucleação secundária em partículas na fase mineral, que surgem da colisão e fratura dos cristais anteriormente formados por nucleação heterogênea.

Fosfatase alcalina

A atividade da fosfatase alcalina está sempre associada à produção de qualquer tecido mineralizado. Nos tecidos mineralizados, a fosfatase alcalina pode ser encontrada livre no interior da matriz, ou associada às vesículas de matriz, quando presentes¹⁷.

3.4 ENXERTOS ÓSSEOS

A literatura sobre enxerto ósseo começa em 1682, com Van Meeken transplantando osso de crânio de cão para o corpo de um homem com defeito cranial, com sucesso. Porém, o cirurgião foi forçado a remover o enxerto do paciente para evitar a excomunhão pela Igreja. 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 de reparação dos enxertos¹⁸.

Técnicas para enxertos ósseos têm sido usadas há mais de 100 anos; Macewen¹⁹ relata um enxerto alógeno de úmero em uma paciente de quatro anos.

Mais de 500 mil enxertos foram executados nos Estados Unidos no campo da odontologia, neurocirurgia e ortopedia.

Há muitas aplicações de enxertos ósseos na medicina e, atualmente, nos campos da cirurgia oral e maxilofacial. Sua necessidade de aplicação cresceu pela demanda das reconstruções dos ossos da maxila e da mandíbula em função da necessidade de colocação de implantes dentários.

Enxertos ósseos autógenos são considerados materiais de escolha nas reconstruções do esqueleto devido a sua grande capacidade de revascularização e incorporação ao leito receptor. Constitui o melhor tratamento clínico e biológico, tendo como desvantagem a necessidade de cirurgia no leito doador, aumentando a morbidade do ato cirúrgico. Assim, o uso de osso alógeno ou xenógeno facilita e simplifica o procedimento e elimina um segundo procedimento cirúrgico de captação do osso da região doadora.

Muitos fatores estão envolvidos no sucesso da cirurgia de enxerto ósseo, incluindo a preparação adequada do leito receptor e do próprio enxerto para que ocorra vascularização e não haja forças de tensão sobre este; estes cuidados tornam o enxerto ósseo suscetível e passível de um bom prognóstico.

O tecido ósseo é considerado ideal para enxertos, uma vez que permite ser transplantado de um local para o outro no mesmo indivíduo ou vice-versa.

O enxerto ósseo pode atuar de três maneiras distintas no processo de reparação óssea: osteogênese, osteoindução e osteocondução, que são requisitos básicos para que ocorra a incorporação do enxerto.

3.4.1 Osteogênese na enxertia óssea

A osteogênese é a formação e o desenvolvimento de tecido ósseo no local da implantação do enxerto e funciona como fonte de células osteoprogenitoras.

Osteoindução

A capacidade de um enxerto de induzir a osteogênese, ou seja, de transformar as células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, numa região onde, espontaneamente, isso não ocorreria se denomina osteoindução²⁰.

A osteoindução induz a uma nova formação de tecido ósseo e ocorre em função de células osteoprogenitoras representadas por células mesenquimais totipotentes presentes no enxerto que se diferenciam em osteoblastos. Essas células com potencial osteogênico trazem as chamadas proteínas morfogenéticas (BMPs), as quais são proteínas osteoindutivas, que com um bom suprimento sanguíneo tornam possível a osteogênese para incorporação do enxerto ao leito receptor²¹.

Osteocondução

A osteocondução se caracteriza pela formação de novo osso sobre um arcabouço aceitável para deposição de novo tecido ósseo, a partir de células osteogênicas do osso já existentes²².

O enxerto osteocondutor permite a aposição óssea a partir do osso existente, mas, ele não produz a formação do osso quando colocado no interior de um tecido mole e, portanto, para que a formação óssea ocorra na sua superfície, necessita-se de osso existente no local receptor²³.

Exemplos de materiais osteocondutores são a hidroxiapatita, o osso congelado, o óxido de alumínio e o óxido de titânio²⁴.

Tipos de enxertos

Enxerto autógeno:

É o enxerto em que o doador é o próprio indivíduo, ou seja, o tecido é removido de uma área doadora e enxertado em outro local no próprio indivíduo.

Enxerto alógeno:

É o enxerto de tecido em que o doador é um indivíduo diferente mas da mesma espécie.

Enxerto xenógeno:

É o enxerto em que o doador é um indivíduo de espécie diferente da do receptor.

Enxerto aloplástico:

É o enxerto em que se utiliza material sintético; é mais usado com o fim de preenchimento.

Estágios de incorporação dos enxertos

A incorporação de um enxerto ósseo apresenta cinco estágios:

1 – Inflamatório: com aumento da atividade osteoclástica;

2 – Revascularização do enxerto;

3 – Osseocondução: o enxerto tem a função de arcabouço para o crescimento de vasos e formação de osso;

4 – Osseoindução: células mesenquimais do hospedeiro são induzidas a se transformarem em osteoblastos;

5 – Remodelação óssea: possui características de formação e reabsorção contínua de osso. A incorporação do osso alógeno ocorre com maior lentidão porque o enxerto desencadeia uma resposta imunológica e interfere na osseoindução e na revascularização adjacentes²⁵.

3.4.2 Enxertos autógenos

O enxerto autógeno carrega uma quantidade ótima de células viáveis osteocompetentes, como osteoblastos e células mesenquimais indiferenciadas, responsáveis pela formação de colágeno e substância fundamental, chamada osteogênese.

Entretanto, o leito receptor deve ter vascularização suficiente para a difusão de nutrientes para células contidas no enxerto.

O enxerto autógeno esponjoso apresenta grande quantidade de osteócitos, osteoblastos, osteoclastos, fibrina, plaquetas, leucócitos e hemácias, enquanto o leito receptor fornece vascularização e células.

Após a colocação do enxerto autógeno, o leito receptor propicia um meio ideal rico em células e vasos; vasos estes que sofrem uma ruptura e transformam o local receptor em um meio hipóxico (tensão de O² de 10 a 30 mms de Hg) e ácido, em que ocorre uma diminuição do Ph, condições favoráveis para que macrófagos e leucócitos polimorfonucleares atuem na eliminação dos restos celulares e promovam a quimiotaxia e a mitogênese²⁶.

Os osteoblastos sobrevivem de 3 a 5 dias após o transplante devido ao seu contato de superfície e à absorção dos nutrientes através do leito receptor. Os osteócitos no interior do enxerto morrem por causa do seu encaixe no mineral, que atua como barreira nutricional.

Os macrófagos são estimulados a secretar o fator de angiogênese derivado do macrófago (MDAF) e o fator de crescimento derivado do macrófago (MDGF).

As plaquetas presas aos coágulos se degranulam e liberam o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que, associado ao baixo gradiente de oxigênio, inicia a angiogênese a partir de capilares adjacentes e mitogênese das células indiferenciadas transferidas pelo enxerto.

Após três dias da colocação do enxerto em seu leito receptor, observam-se brotos de capilares que penetram no enxerto e completam uma trama de vasos, após 10 a 14 dias do procedimento. Esse fenômeno promove o aumento do gradiente de O_2 criando um mecanismo que previne uma angiogênese acentuada, por reversão da hipóxia local, e diminui a ação dos macrófagos (liberação de fatores de crescimento e fator de angiogênese derivados do macrófago (MDAF e MDGF)) para evitar uma resposta indesejável como a hiperplasia.

As células mesenquimais indiferenciadas e os osteoblastos endosteais produzem pequenas quantidades de osteoides sobre as trabéculas mineralizadas.

Após o restabelecimento da rede vascular, essa produção é acelerada, provavelmente, pela disponibilidade de oxigênio e nutrientes. Ilhas de osteoides começam a se formar entre as trabéculas esponjosas do enxertos²⁷.

Essa fase bioquímica e celular da regeneração óssea se funde em ilhas individuais de osteoide na superfície das trabéculas ósseas e do osso hospedeiro para consolidar clinicamente o enxerto; isso se processa entre 3 e 4 semanas da colocação do enxerto.

Esse processo usa a rede de fibrina do enxerto como arcabouço para construir um novo osso, pelo processo chamado osteocondução. Muito embora os osteoblastos sejam células imóveis, estes adquirem certa mobilidade mediante endocitose ao longo da rede de fibrina. Durante essa mobilidade, o osteoblasto secreta o tecido osteoide ao longo do caminho sobre a rede de fibrina.

Essa fase é denominada fase I, cujo tecido formado é desorganizado, semelhante a um calo ósseo, mas tão forte quanto um osso maduro. O último processo na cascata de fenômenos da regeneração óssea é a remodelação, em cujo processo de ativação, reabsorção, formação os osteoclastos ativados produzem as lacunas de Howship. Estes são repovoados por osteoblastos formando osteoide e quando este se calcifica, ocorre a restauração da morfologia óssea.

As células envolvidas no processo ativação-reabsorção-formação são chamadas Unidade Celular Básica (BMU); nos humanos ocorre esta produção em um período de 3 a 6 meses, denominada Sigma²⁸.

A fase II é menos celular e representa a organização estrutural do tecido mineralizado; inicia-se pelos osteoclastos que chegam ao local por meio da rede vascular neoformada.

A reabsorção ocorre pela ação dos osteoclastos que forma um túnel que será repovoado por osteoblastos chamado cone de corte, que atua como uma broca acompanhada das estruturas vasculares que crescem à medida que aumenta a atividade erosiva. À certa distância da frente de erosão, alinham-se osteoblastos nas paredes das erosões, que se dispõem para fechar o túnel criado sem o obliterar, cujo resultado será um novo Canal de Havers²⁹.

Este novo tecido se forma enquanto o osso e o enxerto estão em função. Ocorre maturação dos Sistemas de Havers e do osso lamelar, que resiste às forças normais do maxilar e do impacto de compressão próprios das próteses convencionais e suportadas por implantes.

Histologicamente, o osso sofre remodelação ao longo do tempo, inclusive com desenvolvimento de endósteo e periósteo.

Após essa remodelação, a reabilitação oral com implantes podem ser feitos, num período que varia entre 4 e 6 meses após o enxerto³⁰.

3.4.3 Enxertos alógenos

É a melhor opção depois dos enxertos autógenos e se trata de um excelente material de escolha, pois são tecidos de indivíduos diferentes, porém, da mesma espécie.

Os enxertos alógenos podem consistir em: osso congelado e fresco, osso congelado e seco, matriz óssea desmineralizada^{31 32 33}.

O osso autógeno proveniente da crista ílíaca, embora seja considerado um bom osso para enxerto em reconstruções médicas ou odontológicas, não descarta a necessidade de outras alternativas que tenham uma quantidade óssea disponível suficiente e com menor morbidade do que a remoção de tecidos autógenos.

Historicamente, enxertos alógenos foram usados em cirurgias com necessidade de grandes quantidades de tecidos.

Numa comparação entre osso autógeno proveniente da crista ilíaca em 36 pacientes e osso alógeno proveniente de banco associado a proteínas morfogenéticas (BMPs), também utilizado em 36 pacientes submetidos à cirurgia de coluna cervical realizada por Butterman em 2008, obtiveram-se resultados que demonstraram que o osso alógeno foi tão efetivo no tratamento quanto o osso autógeno³⁴.

Nos anos 1980, cirurgiões que preferiam o uso de enxertos autógenos começaram a substituí-los por enxertos alógenos.

Enxerto ósseo alógeno proveniente de cadáveres tem sido usado para muitos procedimentos com sucesso. Em torno de 1 milhão de transplantes com este material foram realizados nos Estados Unidos desde 2004³⁵.

Anualmente, nos Estados Unidos, 800 mil cirurgias são realizadas com enxertos alógenos; porém, a segurança no seu uso tem sido uma preocupação entre os cirurgiões e alguns padrões foram estabelecidos para melhorar a qualidade e a segurança com o objetivo de excluir riscos de transmissão de doenças.

O osso alógeno é aceito como melhor alternativa como substituto de enxerto autógeno porque, além de apresentar uma menor morbidade, representa bom prognóstico sem toxicidade local, ou sistêmica, o que resulta numa incorporação biológica do enxerto ao final do procedimento^{33 36}.

Em 1977, a *The Food and Drug Administration* publicou um guia de proteção ao doador e, em 1998³⁷, *The American Association of Tissue Banks* publicou as exigências de proteção do doador, de processamento, de etiquetagem e de distribuição dos tecidos³⁸.

Esses enxertos são processados em bancos de tecidos para avaliação do tecido do doador por meio de exames sorológicos e de cultura. Ainda que devam ser satisfeitas tais exigências, não há segurança contra a transmissão viral: pois infecções do tipo Hepatite B e HIV possuem um estágio inicial de 4 semanas, indetectáveis nos testes feitos previamente nos doadores³⁹.

O risco de contaminação pela Aids, Hepatite B, Hepatite C e por outras doenças virais depende do tipo de produto usado e da sua preparação. Enquanto o risco de contaminação pelo HIV é de 1: 450.000, pela Hepatite B é de 1: 46.000 e

pela Hepatite C é de 1: 36.000, em transfusões sanguíneas o risco de contaminação pelo HIV é de 1: 1,6 milhão em relação ao uso de enxertos alógenos^{31 39 40 41}.

A transmissão de doenças, entre elas Síndrome da Imunodeficiência (HIV), Vírus da Hepatite B (HBV) e hepatite C (HCV), depende do processamento desses tecidos e segue as normas das agências reguladoras dos Estados Unidos e da Europa, que desenvolveram guias de usos e processamento seguros de produtos biológicos.

Os tecidos coletados dos doadores sofrem um processo de limpeza que incluem, inicialmente, um debridamento dos tecidos moles, uma lavagem com soro fisiológico, banhos de álcool para desnaturar proteínas, que matam vírus e bactérias, e, ao final do processo de limpeza, estes tecidos ficam embebidos em antibióticos e preservados em baixas temperaturas⁴².

O Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos relatou dois casos de transmissão do vírus HIV, sendo que no primeiro caso a transmissão se deu pela ausência de controle seguro das condições do doador, que poderia ter sido evitada com exames baseados na sorologia e no histórico de injeção intravenosa de drogas ou com uma linfadenopatia. O segundo caso envolve a doação de múltiplos órgãos e tecidos que resultaram na transmissão do vírus HIV, sendo que todos os receptores de órgãos e três dos quatro pacientes receptores de tecidos também estavam contaminados.

Outros 48 receptores dos tecidos alógenos não tiveram contaminação. Esse caso sugere que a remoção total de sangue e a exposição desses tecidos a soluções como etanol, durante o processamento, diminuem o risco de transmissão⁴³
44.

O tecido tratado, osso fresco e congelado, possui alto poder osteoindutivo e osteocondutivo, mas é raramente usado, em razão de sua alta resposta imune e de possíveis transmissão de doenças, comparadas às transmitidas pelo osso congelado e seco, que possui características inferiores com relação à osteocondução e à osteoindução, menor antigenicidade, além de características mecânicas diminuídas⁴⁵.

A osteoindução dos enxertos alógenos varia de acordo com a forma como estes foram processados, e a matriz óssea desmineralizada se mostra com boa aceitação e regeneração pelo tecido do leito receptor³².

O método mais comum de armazenagem de tecido ósseo alógeno é o congelado e seco; porém, é usado o tecido congelado e fresco quando o enxerto necessita de células viáveis.

O osso fresco e congelado é retirado, assepticamente, de doadores vivos ou cadáveres e congelados a -80°C e mantidos em quarentena por seis meses; as proteínas osteoindutivas são preservadas quando não há nenhuma preparação adicional^{33 46}.

O osso alógeno criopreservado seco possui apenas a capacidade osteocondutora e nenhuma capacidade osteogênica e osteoindutora, ou seja, ele apenas permite a osseocondução de células do hospedeiro para o seu interior, o que resulta numa incorporação progressiva do enxerto ao leito receptor. Ocorre uma substituição gradual do osso transplantado por meio de uma atividade osteoclástica intensa, seguida de deposição de osso novo.

A sequência histológica de eventos na incorporação do osso alógeno tem sido muito bem descrita e resumida⁴⁷.

No maciço ósseo alógeno, não vascularizado, ocorre, inicialmente, a formação de um coágulo que contém fatores de crescimento derivados das plaquetas, além de outros fatores de crescimento. Um infiltrado inflamatório local caracterizado por linfócitos também se instala e desenvolve um estroma vascular que traz células precursoras de tecido ósseo ao enxerto. Após a revascularização se inicia uma remodelação até a incorporação do enxerto ao leito receptor.

Do ponto de vista clínico, a incorporação do enxerto se caracteriza pela presença de uma interface leito/receptor/enxerto que tolera forças fisiológicas sobre ele.

Amostras microscópicas de enxertos alógenos removidos, mesmo quando não totalmente revascularizados, apresentam um mesênquima após sofrer metaplasia e posterior ossificação⁴⁸.

A vascularização no osso alógeno congelado e seco é mais lenta que no osso alógeno congelado e fresco; porém, uma vascularização mais rápida é possível com o uso de enxerto ósseo autógeno⁴⁹.

A incorporação é um processo de união entre o osso do leito receptor e o material transplantado com uma mistura de osso necrótico e um novo tecido ósseo. Entretanto, há um atraso na reação inflamatória com retardo na formação de tecido

conectivo; porém, o resultado da incorporação no osso alógeno e no osso autógeno é semelhante⁵⁰.

Análises histológicas de tecido ósseo alógeno enxertado mostraram características de osso maduro assim como uma neoformação óssea incorporada às áreas de enxerto³³.

Em alguns casos, pode ocorrer a substituição incompleta dependendo do tempo, permanecendo um certo volume de osso não vital⁵¹.

Uma das tentativas de se limitar esse processo consiste em perfuração no osso do hospedeiro e no osso a ser transplantado, numa tentativa de se aumentar a vascularização, e conseguir que, pelo menos, a metade do osso enxertado seja substituída por osso novo pelo aumento dos fatores de crescimento e das plaquetas ao local por meio da maior vascularização⁵².

Falhas e complicações em enxertos alógenos medulares são raras e semelhantes aos enxertos corticais ou corticomedulares e às complicações dos tecidos moles, e não necessariamente fazem com que todo o enxerto medular em bloco seja perdido⁵³.

Nos enxertos alógenos, as células autógenas são responsáveis pela formação do novo osso. Essas células migram para o interior da área do enxerto alógeno para ocupar os espaços entre e ao redor das partículas, de modo semelhante ao mecanismo descrito para a osseointegração. Assim, o novo osso se forma por osseocondução a partir de células osteoprogenitoras adjacentes.

O enxerto alógeno é mais usado como suporte estrutural para orientar uma nova formação óssea por um processo de osteocondução. Células adjacentes ao enxerto totipotentes se diferenciam em osteoblastos e depositam a matriz sobre a estrutura do material transplantado.

A osteoindução ocorre quando o osso transplantado contém BMP que estimula uma nova formação óssea⁵⁴.

Em estudo realizado em 2007 por Ting Ma et al. em coelhos, foram feitos enxertos alógenos e autógenos em tíbias de coelhos e foi avaliada a nova formação óssea por meio da atividade de fosfatase alcalina e do número de osteoclastos.

Sem a infusão de fatores de crescimento um nível baixo de crescimento ósseo foi observado, associado a um número alto de osteoclastos no enxerto alógeno quando comparado com o enxerto autógeno.

Com a adição de fatores de crescimento houve um aumento na atividade neoformadora de osso, bem como uma diminuição do número de osteoclastos⁵⁵.

Proteínas morfogenéticas (BMPs)

Em 1965, Urist⁵⁶ postulou a existência de uma proteína que regenerava o tecido ósseo quando exposto a uma desmineralização.

Desde então uma família de proteínas bioestimuladoras não específicas de uma espécie apenas foi identificada e sintetizada em laboratório. Essas BMPs se ligam aos receptores de células mesenquimais indiferenciadas, provocando a sua diferenciação em osteoblastos para fabricar matriz óssea mineralizada.

Estudos demonstram a presença destas BMPs em fraturas ósseas, matriz óssea desmineralizada (DBM). Estas DBMs são obtidas por meio da desmineralização do tecido ósseo cortical com ácidos que removem os componentes minerais e expõem os componentes da matriz que contém BMPs e são potenciais osteoindutores⁵⁷.

Fatores de crescimento

São moléculas naturais iniciadoras universais da maioria dos processos cicatriciais e encontradas no tecido ósseo ou em outros tecidos em fase de cicatrização.

Os fatores de crescimento têm funções específicas durante a regeneração do tecido ósseo, como: promover a quimiotaxia de células totipotentes indiferenciadas, aumentar a mitogênese celular; assim como as BMPs, são também osteoindutivos.

Funções:

- 1- Suprimem a proliferação celular;
- 2- Estimulam a síntese da matriz extracelular;
- 3- Estimulam a neoformação óssea;
- 4- Atraem células por quimiotaxia;

5- Inibem a reabsorção óssea quando atuam sobre os osteoclastos.

Estes são liberados pelos grânulos alfa plaquetários, sendo os principais:

- 1 – PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
- 2 – TGF-Beta – Fator de crescimento de transformação Betas I-II-III
- 3 – IGF-I – Fator de crescimento similar à insulina

Também podem ser secretados pelos macrófagos, células endoteliais, monócitos, fibroblastos e matriz óssea.

O PDGF é o primeiro fator a estar presente na ferida, guia a revascularização, a síntese do colágeno e a regeneração óssea, e, apesar da pequena quantidade, atua como agente mitogênico para a citodiferenciação.

TGF B – Fator de crescimento de transformação beta

Foi inicialmente encontrado em tecidos alterados e constitui uma superfamília de mediadores locais que regulam a função e a proliferação da maioria das células dos vertebrados.

IGF-S I e II – Fator de crescimento similar à insulina

É fator de crescimento secretado pelos osteoblastos durante a formação óssea para aumentar e acelerar a deposição da matriz óssea; é mitogênico para células de linhagem osteoblástica e estimulador da osteogênese a partir de osteoblastos diferenciados, promove a deposição da matriz óssea, possui atividades de quimiotaxia para fibroblastos, osteoblastos e células progenitoras dos osteoclastos.

O mecanismo de ação dos fatores de crescimento em áreas de enxerto ósseo ocorre dentro de um ambiente bioquímico complexo, onde o tecido enxertado deve progredir de um tecido transplantado para um tecido autossustentado⁵⁸.

Enxertos alógenos formam um arcabouço para a formação de um novo osso; porém, este não contém osteoblastos ou células osteoprogenitoras vivas e possui um nível baixo de fatores de crescimento próprios do tecido ósseo⁵⁵.

O coágulo sanguíneo presente no enxerto contém fibrina, fibronectina, hemácias, leucócitos e plaquetas. Após 10 minutos da coagulação as plaquetas degranulam e secretam fatores de crescimento que atuam nos vasos sanguíneos seccionados das paredes ósseas para induzir o crescimento capilar dentro do volume do enxerto, enquanto outros atuam nas paredes ósseas do leito receptor para iniciar a migração, diferenciação e sequência da produção da osseointegração³⁰.

As células osteoprogenitoras migram sobre a rede de fibrina que está nos espaços entre o osso receptor; o enxerto está junto ao osso receptor para formar uma substância cimentante e produzir osso, o que tornará o enxerto mais estável. A diferenciação e a migração destas células necessitam de mais tempo e formam menos volume ósseo quando se trata de um enxerto alógeno⁵⁹.

O osso alógeno fresco apresenta antigenicidade dos tecidos coletados dos doadores, os quais induzem a respostas imunes sistêmicas e locais que diminuem, ou destroem, os processos osseointutivo e osteocondutivo. A refrigeração tem sido usada para melhorar a sua incorporação pelo hospedeiro por meio da redução do seu potencial antigênico.

A penetração vascular é mais demorada, a formação óssea mais lenta, ou incompleta, do enxerto.

Imunogenicidade

Transplantes de tecidos, particularmente tecido ósseo, diferem substancialmente dos transplantes de órgãos. A imunogenicidade é fraca e está relacionada com o colágeno e as moléculas da matriz orgânica. Ainda que haja uma resposta imunogênica dos aloenxertos, as células e as proteínas da matriz orgânica são diminuídas na sua intensidade e frequência nos enxertos alógenos frescos e congelados e, ainda mais, nos enxertos alógenos congelados e secos; onde não há vascularização nem células vivas do doador, não há, portanto, um alvo claro para que haja uma reação antigênica⁴⁷.

Aho A. J. et al. (1998) em seus estudos não observaram reações alérgicas significativas, rejeição nem nenhuma reação antígeno-anticorpo em transplantes alógenos frescos e congelados num período de 30 anos⁶⁰.

Entretanto, há ao menos dois estudos sobre enxertos alógenos congelados que relatam alguns casos de imunização pelo Fator Rh em mulheres que receberam enxertos alógenos frescos de doadores com fator Rh (-) negativo, o que sugere que mulheres que tenham o fator Rh negativo devem receber enxertos de doadores com o mesmo fator Rh, ou seja, negativo⁶¹.

3.4.4 Enxerto xenógeno

Consiste em tecidos derivados de espécies diferentes; geralmente, estes tecidos possuem origem bovina e são usados amplamente.

O enxerto xenógeno caracteriza-se por um osso bovino mineral desproteinizado com material orgânico removido. Este processo mantém os cristais de hidroxiapatita que são cristais comuns ao tecido ósseo de quaisquer espécies. São particulados com alta porosidade, poros esses com aproximadamente 0,25 a 1 mm.

As dimensões destes poros conferem ao enxerto propriedades osteocondutivas, ou seja, promovem a migração de células osteoblásticas no interior do enxerto pelos poros permitindo a osteogênese⁶².

Os poros são responsáveis pelo aumento de 75% em área, o que torna esse material com uma osteocondutividade excelente, mas compromete a estabilidade inicial do enxerto. Esse aumento da superfície também facilita a angiogênese para promover a integração osso/enxerto^{63 64}.

Um estudo com enxertos com Bio-Oss em sinus lift mostra um aumento de 39% de ganho de um novo tecido, comparado ao enxerto autógeno que mostrou um aumento em 40% após 6 meses de controle⁶⁵.

3.5 BANCO DE TECIDOS

Considerações éticas e legais

O Brasil dispõe atualmente de sete bancos de tecidos musculoesqueléticos regulamentados e autorizados pelo Sistema Nacional de Transplantes – Ministério da Saúde (SNT-MS); somente essas entidades estão aptas a captar, processar, armazenar e distribuir os tecidos com finalidade de transplantes ósseos no país.

A autorização para transplantes de tecido ósseo na Odontologia teve início em 2005, pelo início do credenciamento nacional de odontólogos especializados nas áreas de Implantodontia, Periodontia e BMF pelo SNT-MS. As exigências deste credenciamento foram definidas após entendimentos com os Conselhos Regionais e Federal de Odontologia.

A utilização dos transplantes ósseos relacionados à Odontologia no Brasil aumentou significativamente nos últimos anos e levou o SNT-MS a autorizar o cirurgião-dentista a ser um transplantador, desde que este profissional seja qualificado, habilitado e registrado no SNT-MS.

Como exemplo de outros bancos de tecidos internacionais, cita-se o banco da Universidade Clínica de Navarra, operante desde 1986, com uma casuística de mais de 3 mil enxertos em vários tipos de cirurgia⁶⁶.

Os doadores de ossos podem ser pacientes vivos que, por problemas ortopédicos, serão submetidos a procedimentos como a artroplastia do quadril com consequente remoção da cabeça do fêmur e parte do acetábulo, ou a retirada da calota craniana em pacientes submetidos a craniotomia descompressivas. Em ambos os casos, esses tecidos poderão ser utilizados como transplantes autólogos, ou seja, com a finalidade de transplantes.

Os doadores com diagnóstico de morte encefálica, após todo um processo de rigorosa triagem, têm os tecidos musculoesqueléticos retirados num período de até 12 horas após a isquemia (clampeamento para retirada de órgãos perfundidos), evitando assim uma possível contaminação após cessar a circulação sanguínea, ou em até 24 horas no caso de permanência do doador em refrigeração. Os Bancos de Tecidos ainda podem captar, processar e disponibilizar tecidos

autólogos, com calotas cranianas retiradas pós-craniotomias descompressivas ou mesmo novamente as cabeças femorais retiradas pós-artroplastias que são novamente implantadas em revisões de artroplastias ou em reconstruções odontológicas no mesmo indivíduo.

3.5.1 Captação dos tecidos

A obtenção dos tecidos musculoesqueléticos tem como fonte os doadores com confirmação de diagnóstico de morte encefálica, notificados pelas Comissões Intra-hospitalares – CIHDOTs, Organizações de Procura de Órgãos – OPOs e Centrais de notificação e captação de órgãos e tecidos – CNCDOs, que totalizam 23 centrais espalhadas, logisticamente, pelo Brasil.

As notificações para as equipes captadoras são realizadas após a execução de uma série de procedimentos e exames que visam, além da comprovação da morte encefálica, o consentimento familiar do processo de doação de órgãos e tecidos.

A seleção dos doadores segue um rigoroso controle com investigação sorológica para antígeno e anticorpo HIV, Hepatites A, B e C, HTLV-1 e 2, Sífilis, Chagas, Toxoplasmose e Citomegalovírus, além dos testes de última geração na evidenciação de DNA (*Nucleic Acid Amplification* – NAT) para HIV e Hepatite B e C, exigidos quanto aos tecidos musculoesqueléticos.

A captação dos tecidos musculoesqueléticos (ossos e tendões) é realizada após a triagem inicial dos doadores de múltiplos órgãos e tecidos (coração, rim, fígado, pâncreas, pulmão, córnea etc.), e todo processo de doação é registrado em formulários específicos.

Excluem-se doadores com patologias ortopédicas como osteoporose, osteonecrose, artrite reumatoide, lupus eritematoso, neoplasias, faixa etária que comprometa a característica dos tecidos, transfusão sanguínea, tatuagens ou adereços (*piercings*) dentro do período de uma janela imunológica, usuário de drogas ilícitas, permanência em zonas endêmicas, infecções generalizadas ou localizadas, fraturas, escoriações nos membros em que serão captados os tecidos musculoesqueléticos ou qualquer outra situação que coloque em dúvida a qualidade desses tecidos, conforme dispostos nas legislações vigentes: Portaria nº 1.686 do

MS de 20 de setembro de 2002 e RDC nº 220 da ANVISA, publicada em 27 de dezembro de 2006.

O plano de captação é programado previamente: tecidos com prioridade de retirada são os tecidos mais utilizados em cirurgias ortopédicas e odontológicas ou aqueles solicitados, especialmente, pelos cirurgiões.

Os tecidos retirados são embalados, imediatamente, em invólucros triplos, selados hermeticamente e encaminhados sob refrigeração (-4 °C) ao Banco de Tecidos.

Ao término da captação, os tecidos são armazenados, refrigerados em geladeiras portáteis com monitoração de temperatura durante todo o período de transporte.

A etapa do processamento em sala cirúrgica própria classificada (classe 100 ou ISO 5) e equipada com módulo de fluxo laminar.

A sala também possui antecâmara e *pass-trought* e todos os ambientes possuem rigoroso controle de partículas de ar e pressão positiva para garantia de qualidade dos tecidos lá processados.

Além disso, é necessária a paramentação específica da equipe profissional que deve utilizar somente roupas não tecido para evitar a dispersão de partículas que as roupas de algodão provocam.

O BTME realiza vários tipos de processamentos desses tecidos com finalidade de utilização em cirurgias ortopédicas e odontológicas, cada qual exigindo um planejamento específico.

Para o processamento de tecidos frescos congelados é realizado o processamento mecânico, ou seja, a remoção de tecidos adventícios como sangue, perióstio, subcutâneo, músculos, e tecido fibrótico.

Em seguida, os tecidos são imersos em soluções emulsificantes à base de peróxido de hidrogênio e álcool sob agitação ultrassônica.

Logo após, uma coleta de amostras destas soluções resultantes, de medula óssea dos ossos longos e de fragmentos de cada tecido em processamento é submetida a exames microbiológicos (Cultura Geral, Cultura de Anaeróbicos e Fungos). Além disso, são também obtidas amostras para análise anatomopatológica.

Os enxertos processados são acondicionados em invólucros triplos estéreis, selados a vácuo e devidamente identificados em uma etiqueta (Figura 7), com as medidas do tecido (comprimento, altura, diâmetro, peso, volume, perímetro), informações do doador, exames realizados, número de lote, item, data de validade, tipo de conservação e código de barras⁶⁷.

IOT - Instituto de Ortopedia e Traumatologia - HCFMUSP Banco de Tecidos		
Tecido:	FILETE DIAFISE TIBIA	Código: 8041
Item:	FILTIB	Nº Lote: 009/10
DC / CNCDO:	075464-151	
Captado em:	08/09/2010	Validade: 07/09/2015
Dimensão:	P5 33 X 15 X 4 MM (1,9 CC)	
Conservação:	CRIO -80, RH+, NÃO UTILIZAR IMUNODEPRIMIDO	
Anato Patológico:	NORMAL	Radiografias: NORMAL
Cultura Geral:	NEGATIVO	Cult. Anaeróbio: NEGATIVO
Cultura Fungos:	NEGATIVO	HIV: NEGATIVO
Anti-HBC:	NEGATIVO	VDRL: NEGATIVO
HCV NAT:	NEGATIVO	HTLV I: NEGATIVO
HIV NAT:	NEGATIVO	HTLV II: NEGATIVO
CHAGAS:	NEGATIVO	CMV: IgM NEGATIVO
HBS AG:	NEGATIVO	TOXO: IgM NEGATIVO
Prof. Dr. Alberto T. Croci		Telefone: 3069-6776

Figura 7 Etiqueta de identificação do tecido ósseo – Banco de tecidos

Assim que todos os tecidos estiverem identificados, são radiografados no próprio BTME e encaminhados a criopreservação⁶⁸.

Os ossos também podem ser processados em sua forma liofilizada, onde toda água é removida com o tecido ainda congelado. O processo consiste em colocar o tecido em uma câmara liofilizadora onde os cristais de gelo presentes sublimam pela ação da alta pressão, não passando pela fase líquida e, portanto, mantendo a viabilidade da matriz óssea. O resultado é um tecido seco, conservável em temperatura ambiente e devendo receber esterilização final por irradiação.

Ao término dos processamentos, é realizada a documentação do procedimento no Termo de Processamento e arquivado no prontuário do doador.

O estoque dos tecidos pode ser mantido tanto congelado quanto liofilizado, se necessário, segundo os mesmos padrões utilizados pelas Associações e pelos Bancos de Tecidos mundiais.

Para a esterilização terminal dos enxertos alógenos recomenda-se o uso de irradiação com raios Gamma, cuja densidade de energia varia em cada banco de tecidos. Enquanto alguns adotam densidade de energias altas de irradiação, outros, porém, adotam densidade de energias chamadas mais baixas de 15 kGy, como sugere o Queensland Bone Bank⁶⁹. Baker, T. F. et al., em estudo realizado com 100 amostras de osso humano alógeno, conseguiram a esterilização com Gama 60 Co numa densidade de energia mínima de 9,2 kGy⁷⁰.

Há aqueles que não adotam a irradiação como forma de esterilização terminal destes tecidos. A irradiação com Cobalt 60 afeta as propriedades mecânicas e biológicas do tecido ósseo irradiado, pois ocorrem degradação do colágeno da matriz óssea e alteração nos osteoblastos; esses efeitos estão relacionados com a variância da densidade de energia usada, ou seja, quanto maior a densidade de energia irradiada, maiores os efeitos deletéricos nos tecidos. Em densidade de energias menores que chegam até 25 kGy, a relação entre essas alterações não está muito clara⁷¹.

Com todas estas variações foi desenvolvido um padrão de segurança que sugere a densidade de energia de 25 kGy de raios Gamma. Esta densidade de energia é recomendada, atualmente, para esterilização final de produtos médicos e para a aplicação em banco de tecidos para a manutenção da esterilização do tecido ósseo proveniente de doadores^{32 72}.

Love D. et al. 2009, em estudo com 316 pacientes e 362 procedimentos cirúrgicos em um período de 10 anos, provenientes de 811 doadores, com o uso de tecido ósseo femural alógeno não irradiado durante o seu processamento, mostraram resultados seguros para usos locais⁷³.

Na captação dos tecidos, duas situações são importantes:

- 1- Remoção de parte do material coletado para exames sorológicos que garantam a segurança para uso médico-odontológico;
- 2- Confirmação de ausência de contaminação.

Os ossos são captados e armazenados em embalagens triplas de poliamida número 6, estéreis e resistentes ao ultracongelamento em torno de -80 °C, com a etiqueta “tecidos de uso não liberados”.

Durante o período de quarentena, no qual se realizam os exames sorológicos, o tecido doado permanece guardado. Somente a partir dos resultados favoráveis, inicia-se o processamento dos ossos para a finalidade de transplantes.

A esqueletização do tecido é feita com a remoção de todo o tecido mole existente e, após esse processo, alguns bancos de tecidos realizam a lavagem dos tecidos com uma combinação de antibióticos (polimixina B e vancomicina) e o procedimento de lavagem interna dos tecidos para a remoção dos elementos sanguíneos remanescentes e do tecido gorduroso, que interferem e atrasam a vascularização e a incorporação dos enxertos ósseos^{15 74}.

Com a limpeza externa e interna, os tecidos são recortados em diferentes tamanhos e formatos para se adequarem às peças nos tamanhos usados nas cirurgias de transplantes odontológicos. Geralmente, os tecidos são cortados em cubos corticais, corticomedulares ou fragmentados em partículas para serem usados na forma de grânulos.

Importante ressaltar que os cortes do tecido ósseo são mapeados e, juntamente com o prontuário do doador, armazenados por 20 anos para segurança dos receptores e profissionais que realizam transplantes.

Os tecidos são embalados, novamente, em embalagens triplas esterilizadas, plásticas ou de vidro, resistentes ao ultracongelamento, com uma etiqueta onde constam todos os dados do Banco de Tecidos: código do doador, exames realizados, forma de processamento, técnica de esterilização adicional, número do item e lote, formato e características do tecido, condições de armazenamento e prazo de validade determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e pelo Banco de Tecidos.

A grande morbidade pós-operatória oriunda das diversas técnicas de enxertia óssea autógena demanda a busca por substitutos ósseos adequados para o processo de enxertia.

Nosso estudo está direcionado para os enxertos alógenos, ou seja, realizados com tecido ósseo de doadores de órgãos de indivíduos diferentes, porém, da mesma espécie.

Tradicionalmente, o osso alógeno vem sendo processado por várias técnicas:

- 1 – somente congelamento ou osso fresco congelado;
- 2 – congelamento associado à desidratação ou à liofilização;
- 3 – liofilização associada à desmineralização ou a osso desmineralizado.

O uso do osso alógeno fresco, ou osso sem nenhum tipo de processamento, não é aceito pela ciência dado seu potencial imunogênico.

Os ossos liofilizados e os liofilizados desmineralizados, apesar da grande aplicabilidade clínica, apresentam potenciais osteoindutores reduzidos ou nulos pelos processos de liofilização e esterilização. Estes ossos apresentam baixa resistência mecânica e impossibilitam a sua utilização na forma de blocos ósseos⁴⁰
71.

A utilização de osso alógeno representa nova opção de enxertos ósseos, pois podem ser mantidos congelados e sem desidratação, mantêm a capacidade de osteocondução e osteoindução, diferentemente do osso liofilizado, ou irradiado, que reduz os potenciais osteoindutores em pelo menos 50% dos casos^{75 76 77}.

Os implantes osseointegrados, comprovadamente, vieram solucionar problemas e otimizar resultados na Odontologia moderna. Porém, um dos requisitos principais para sua instalação no meio bucal é a quantidade e qualidade óssea. Com grande frequência, há situações em que o tecido ósseo remanescente não preenche tais requisitos.

Os implantes dentais tiveram suas fixações limitadas a áreas com estrutura óssea disponível em altura e largura. Breine e Bränemark (1980)⁷⁸ propuseram várias técnicas de enxerto, com objetivo de aumentar altura e largura óssea e o propósito de ampliar as indicações das reabilitações com implantes. Abrektsson em 1980⁷⁹ estudou a regeneração óssea e descreveu as fases da cicatrização e remodelação dos enxertos ósseos; estabeleceu também os princípios da osseointegração. Em 1992, Perrot et al.³⁹ descreveram os resultados com o uso de osso fresco congelado isolado, ou combinado com osso autógeno, para a reconstrução dos maxilares com finalidade de reabilitação com implantes.

3.6 EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA REPARAÇÃO ÓSSEA

O termo *laser*, procedente da língua inglesa, é acrônimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação). É uma forma de energia que se transforma em energia luminosa, visível ou não, dependendo da matéria que produz esse tipo de radiação.

O *laser* é uma radiação que se encontra no espectro de luz que varia do infravermelho ao ultravioleta, passando pelo espectro visível. Essa radiação eletromagnética, não ionizante, com características bastante distintas de uma luz fluorescente ou de uma lâmpada comum, representa essas condições especiais, como monocromaticidade, coerência e unidirecionalidade, e faz esse tipo de luz ter propriedades terapêuticas importantes.

Os *lasers* são divididos em dois grupos, de acordo com a potência de emissão da radiação: *laser* de alta intensidade ou Hilt (*High-Intensity Laser Treatment*), que emite radiação de alta potência e possui potencial destrutivo normalmente utilizado em cirurgias, com função de cortar, coagular e vaporizar os tecidos.

Os principais *lasers* de baixa intensidade são compostos por um meio ativo gasoso (He-Ne) ou semicondutor (diodo-AsGa;AsGaAl).

De um modo geral, o LILT tem uma série de indicações e pode ser usado isoladamente ou como coadjuvante de outros tratamentos.

Laser não cirúrgico, ou Lilt (*Low-Intensity Laser Treatment*), emite radiação de baixa potência, sem potencial destrutivo, promove a bioestimulação sobre os processos moleculares e bioquímicos, além de possuir ação de analgesia e anti-inflamatória, uma vez que estimula a microcirculação devido a um aumento da circulação periférica, promove a bioestimulação das células e melhora a capacidade de regeneração tecidual.

Várias pesquisas atestam que o *laser* promove a bioestimulação das células, melhorando sua capacidade de regeneração óssea; entretanto, seu uso ainda causa controvérsias, uma vez que os efeitos biológicos e a dosagem de irradiação não possuem protocolos definidos⁸⁰.

A energia luminosa do *laser* é depositada nos tecidos produzindo efeitos que estimulam a liberação de substâncias como histamina, serotonina e bradicinina. Ativa a produção de ácido aracnoico e transforma as prostaglandinas em prostaciclina. A bioestimulação aumenta a quantidade de ATP, acelera as mitoses, atua no equilíbrio do potencial da membrana, melhora a reparação tecidual, estimula a regeneração do tecido ósseo e equilibra a produção de fibroblastos, com normalização no depósito de fibras colágenas e elásticas no tecido em reparação. Aumenta a circulação, melhora a ação anti-inflamatória e a cicatrização dos tecidos⁸¹.

Vários estudos vêm sendo realizados a respeito dos efeitos da LILT na área da saúde e na biologia, representando assim um coadjuvante no tratamento de um grande número de patologias.

Muitas evidências permitem concluir que o tratamento através da LILT pode influenciar no comportamento de muitos tipos de células que acarretam efeitos múltiplos⁸². Entre eles, podemos citar: aceleração no processo de cicatrização de feridas, melhor regeneração e remodelação óssea, atenuação dos processos dolorosos, pela liberação de endorfinas, regulação do sistema imune, entre outros.

Embora a aceleração da regeneração óssea pelo *laser* seja relatada, seu mecanismo de ação ainda permanece obscuro⁸³.

O tratamento com a terapia *laser* em baixa intensidade é baseado nos efeitos fotoquímicos e fotobiológicos, provocados pela absorção da energia dos fótons sobre as células dos tecidos. A terapia *laser* em baixa intensidade é aplicada após a instalação dos implantes, com finalidade de produzir respostas favoráveis ao tecido ósseo que sofreu injúria tecidual seguida de desordem funcional.

Foi feito um estudo com 12 ovelhas em que foram inseridos implantes dentários sendo estes irradiados 3 vezes por semana com *Laser* de Diodo (75 mW, 680 nm), com uma densidade de energia por irradiação de 3 - 4 J/cm²; após 4 e 12 semanas, entretanto, a regeneração óssea não diferiu do lado controle; as medições da osseointegração resultaram significativamente num maior contato entre osso/implante, portanto, ocorreu uma superfície de contato maior entre osso implante nos tecidos irradiados⁸⁴.

Garavelo-Freitas em 2003⁸⁵ estudou os efeitos do *laser* de baixa intensidade com He-Ne, no processo de reparação em tíbias de ratos, que foram

irradiadas com uma potência de 1 mW, com exposições diárias de 30 s, 5 min, e 15 min., com densidade de energia de 3,15 J/cm², 31,5 J/cm² e 94,5 J/cm² por 7 ou 14 dias consecutivos.

Os resultados mostraram que as tíbias irradiadas com 3,15 J/cm² não apresentaram, aparentemente, nenhuma diferença em relação ao grupo controle. Para densidade de energia de 31,5 J/cm² e 94,5 J/cm², observou-se uma aceleração evidente na reparação óssea, principalmente no grupo irradiado por 7 dias. Na segunda semana de irradiação do *laser* houve uma diminuição do efeito da osteogênese.

Muito embora os mecanismos biológicos na aceleração da reparação óssea dos tecidos irradiados com *laser* de baixa intensidade não sejam claramente conhecidos, a hipótese provável é que a energia do *laser* excite porfirinas e citocromos, também cromóforos intracelulares, e aumentem a atividade celular através do acréscimo de concentração de ATP, ALP com a liberação de cálcio⁸⁵.

Em outro estudo da mesma autora realizado com 36 ratos avaliou-se a consolidação óssea da tíbia por meio de análise histomorfométrica, utilizando *laser* He-Ne com densidades de energia de 0,3 J/cm² e 0,9 J/cm² com tempo de irradiação de 5 a 15 min. Observou um aumento do trabeculado comparado ao grupo controle no 7º dia de irradiação; a densidade de energia de 0,3 J/cm² teve um maior efeito no aumento da área.

Comparando-se o 7º com o 14º dia de irradiação nas densidades de energia de 0,3 J/cm² e 0,9 J/cm², percebeu-se uma diminuição do trabeculado ósseo, principalmente na densidade de energia de 0,9 J/cm². Portanto, a irradiação favorece o aumento do trabeculado ósseo e acelera a organização das fibras colágenas; porém, aumenta o número de osteoclastos, o que pode ser a causa da possível diminuição do trabeculado ósseo no 14º dia de irradiação⁸⁶.

Silva Junior et al.⁸⁷, utilizando o *laser* As-Ga-Al, 830nm, 40mW, no reparo ósseo de fraturas de fêmures de ratos, constataram que há relação entre a eficiência e o estágio em que são feitas as aplicações. Eles observaram que o *laser* foi mais eficaz em estágios iniciais de reparação (7 dias após a lesão) quando comparados com estágios tardios (28 dias após a lesão). Isso sugere que o estímulo à formação óssea decorrente da LLLT atua em estágios proliferativos e precoces da diferenciação de células e precursores, e não em estágios tardios⁸⁷.

A luz *laser* com um comprimento de onda adequado penetra na pele, ativando fotorreceptores específicos que biomodulam tecidos profundos. Estudos sugerem que a estimulação do citocromo c oxidase que é o principal fotorreceptor primário na corrente de transporte de elétron mitocondrial⁸⁸.

A penetração nos tecidos humanos está relacionada com a potência do *laser* e seu comprimento de onda. 4J/cm² é o suficiente para uma adequada penetração na região da articulação na clavícula, comparado com 40 J/cm² para a região dos quadris num comprimento de onda entre 780 e 820 nm com um *laser* de GaAs.

A penetração máxima com o *laser* de baixa intensidade é de aproximadamente 50 mms⁸⁹. Scopin et al. usaram o *laser* num comprimento de onda de 980 nm numa cultura de fibroblastos, o que resultou num aumento do crescimento celular associado a um aumento de temperatura; entretanto, um aumento no nível de exposição em até 66 J/cm² inibiu o crescimento.

Portanto, um efeito benéfico da luz *laser* ocorre numa densidade de energia que varia de 1 a 10 J/cm²⁹⁰. Pinheiro e Gerbi, em 2006, demonstraram que a laserterapia é importante na aceleração da reparação óssea utilizando cultura de células osteoblásticas. Os resultados destes estudos mostram que a irradiação de tecido ósseo no infravermelho revela uma proliferação osteoblástica acelerada, deposição de colágeno e neoformação óssea quando comparados com tecidos não irradiados.

Aventou-se que o efeito da laserterapia é mais eficaz se o tratamento for realizado nos estágios iniciais, quando a proliferação celular é mais elevada. Os autores propõem que este efeito não depende da densidade de energia total de irradiação, mas do tempo e da modalidade da aplicação. A densidade e a intensidade de energia são parâmetros independentes e a essa independência pode estar relacionado o sucesso ou o fracasso da laserterapia⁹¹.

Vários efeitos bioestimuladores do LILT têm sido mostrados desde 1971⁹², e a aceleração na formação de tecido ósseo, após a irradiação com *laser* de baixa, tem sido foco de muitas pesquisas, baseadas em achados clínicos ou estudos feitos em modelos experimentais *in vivo*⁹³.

Estudo feito com 36 ratos Wistar divididos em 2 grupos, sendo 18 deles irradiados com (GaAlAs) *laser* 830nm, sistema contínuo com 40mW de potência e

4J/cm² e outro grupo de 18 ratos não irradiados, confirmou os efeitos positivos da LILT na aceleração da neoformação óssea.

A irradiação com a LILT foi significativa na aceleração do processo reparativo do tecido ósseo em até 8 semanas, quando comparada com tecidos ósseos não irradiados; entretanto, após 12 semanas, quando o tecido se apresenta como um osso maduro, não se identificam diferenças nos tecidos irradiados e no não irradiado.

Foram observados os efeitos do *laser* sobre o processo de consolidação de fraturas fechadas e não imobilizadas de tíbias de ratos. Os animais foram divididos em dois grupos: o primeiro grupo foi irradiado com *laser* com 6J/cm² de densidade de energia, durante dois minutos, com aplicação do tipo contato, sobre o foco de fratura, a cada dois dias, e o segundo não recebeu intervenção do *laser*. Os resultados não demonstraram maior estímulo à osteogênese em animais submetidos à terapia com *laser*. Nas condições estudadas, observou-se que o *laser* He-Ne não acelera o processo de consolidação óssea em fraturas fechadas e não imobilizadas⁹⁴.

A LILT tem demonstrado resultados favoráveis *in vivo* e *in vitro* quanto ao estímulo na reparação óssea. Nesse sentido, trabalhos *in vivo* sugerem que essa terapia promove aceleração na reparação óssea alveolar, na neoformação óssea pós-disjunção palatina em ratos^{95 96}.

As proteínas são a maior estrutura absorvedora de comprimentos de onda dos *lasers* que atuam na faixa do vermelho visível e infravermelho. Entretanto, a identidade dos fotorreceptores responsáveis pelos efeitos biológicos da LILT não é claramente descrita.

Muitos estudos sugerem que o sistema mitocondrial ou as porfirinas endógenas da célula sejam os cromóforos absorvedores de energia nessa terapia.

Os efeitos da bioestimulação pelo LILT, como na cicatrização de feridas, na proliferação celular, que age na diminuição da resposta inflamatória, e nas células do tecido ósseo, têm sido estudados. Entretanto, o mecanismo básico molecular não está totalmente elucidado.

Tecnologia avançada e resultados obtidos por meio do Projeto Genoma buscam o gene que regula esses sistemas. Neste estudo, focaram-se as características dos genes alterados nos osteoblastos irradiados pela LILT.

Os genes que foram alterados pela irradiação incluem o da síntese de ATP, o da replicação de DNA, a sinalização celular, enzimas, proteínas estruturais e outros genes com funções desconhecidas.

Yamamoto et al.⁹⁶ verificaram que, após a irradiação com o *laser* 830 nm, a síntese de mRNA para os genes MCM3, que estão envolvidos com a replicação de DNA nas células eucarióticas, estava aumentada em culturas de osteoblastos, o que poderia ser a explicação para o aumento da proliferação celular após a irradiação com *laser*⁹⁷.

O LILT sugere a ocorrência de efeitos de bioestimulação, pelas alterações em níveis genéticos, que alterem o mecanismo de reparação do tecido ósseo, ainda não totalmente compreendidas⁹⁸.

Estudos sugerem que a irradiação com a LILT tem duas formas de ação sobre a da osteogênese. Uma das formas é a estimulação da proliferação celular, especialmente as células de linhagem osteoblástica, e a outra é a estimulação da diferenciação celular, especialmente em osteoblastos, resultando num número maior desse tipo de células e conseqüentemente numa maior neoformação óssea⁹⁹.

Toda reparação óssea necessita dos osteoblastos (célula formadora de matriz óssea); um dos procedimentos que podem aumentar o número de osteoblastos por indução à mitose é a irradiação de *Laser* de Baixa Intensidade (LBI). Segundo KARU, em 1989¹⁰⁰, o LILT, quando aplicado sobre uma célula, atua sobre as mitocôndrias dessa célula aumentando a produção de ATP e, conseqüentemente, induzindo a célula a um aumento na proliferação e na síntese proteica.

O efeito bioestimulador da radiação do *laser* de baixa intensidade, diretamente sobre a produção de ATP mitocondrial, e o estímulo trófico que aumenta a neoformação capilar e a multiplicação celular podem melhorar a reparação cicatricial dos enxertos ósseos homogêneos, uma vez que, logo após a implantação do enxerto na área receptora, as células são nutridas por difusão, e em 5 a 7 dias se inicia o processo de angiogênese e revascularização^{101 102 103}.

Esses aspectos podem resultar tanto no aumento da liberação dos mediadores quanto na microvascularização, o que vai acelerar a cicatrização óssea.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos da pesquisa

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais do Instituto de Pesquisas Energéticas do Estado de São Paulo (IPEN), sob número 79/11 – CEUA-IPEN/SP (Anexo).

4.1 MATERIAL

4.1.1. *Laser*

Foi utilizado um *laser* de diodo de baixa intensidade com as seguintes características:

Modelo: Twin Laser

Marca: M.M. Optics – São Carlos-SP

Emissão utilizada: infravermelho 780 nm (GaAIAs)

Modo de operação: contínuo

Potência máxima: 70mW

4.1.2. Caracterização das amostras

Nos experimentos foram utilizados 36 coelhos. *Oryctolagus Cuniculus*, da linhagem *New Zeland*, machos, não isogênicos, adultos, com peso de aproximadamente 3 a 3,5 kg, com idade entre 6 e 8 meses.

Os animais, nascidos e criados no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, estavam clinicamente saudáveis e livres de ecto e endoparasitas, sendo considerados aptos para esta pesquisa.

Três coelhos foram utilizados no processo de captação de tecido ósseo, padronizados conforme Banco de Tecidos, processados e criopreservados até o seu uso. Foram feitos exames de cultura das amostras coletadas e estes animais representaram doadores de enxerto ósseo alógeno.

Os 33 coelhos restantes foram divididos em três grupos experimentais com 11 amostras de cada que representaram os animais receptores dos enxertos.

Amostras doadoras de tecidos

Coleta, processamento e armazenamento

Coleta do Material

Foram coletadas amostras de tecido ósseo oriundo das epífises e diáfises tíbias e dos fêmures dos animais da amostra doadora, sendo esqueletizados e processados (Figuras 7 e 8).

Processamento do material e armazenamento

Após a esqueletização, todo o material foi particulado em um triturador ósseo automático, acondicionado em um saco plástico esterilizado com óxido de etileno e processado através de lavagem com soro fisiológico a 0,9%, em seguida foi submetido a imersão em peróxido de hidrogênio a 10% e álcool sob agitação, para remoção do material orgânico remanescente.

Após todo o escoamento do líquido do tecido foi iniciado o procedimento de armazenamento em 33 embalagens plásticas duplas esterilizadas, seladas a vácuo com volume aproximado de 1cc., e conservadas a -80 °C, em freezers próprios para este fim, até o seu uso (Figuras de 9 a 14).

Uma fração coletada destas amostras foi submetida ao exame microbiológico (Cultura Geral, Cultura de Anaeróbicos e Fungos). Embora os coelhos fossem nascidos e criados dentro do Biotério da FMUSP, não se eliminaram os riscos de serem contaminados pelo próprio ambiente e se comprometer o fim aos quais se destinavam, ou seja, pesquisas⁶⁷.



Figura 8 Centro de coleta e processamento de tecidos do IOT da FMUSP



Figura 9 Coleta de tecido ósseo para processamento



Figura 10 Acondicionamento do material para esqueletização



Figura 11 Esqueletização dos tecidos



Figura 12 Processamento do material triturado



Figura 13 Material processado



Figura 14 Armazenamento do tecido ósseo



Figura 15 Material preparado para congelamento

Amostras receptoras de tecido

Manutenção dos animais

Durante todo o experimento os animais foram mantidos no Setor de Experimentação do Centro de Bioterismo da FMUSP, em condições sanitárias convencionais, em local adequado para manutenção, durante toda a fase de observação pós-operatória.

Este acondicionamento foi feito em gaiolas metálicas, individuais, específicas para manutenção de coelhos em laboratório. Os animais foram

alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*, em ambiente limpo e protegido de estímulos auditivos externos para que se evitassem situações de estresse. A temperatura foi mantida entre 18 e 24 °C com uma umidade relativa do ar entre 40 e 70%, e com uma luminosidade artificial de 10 a 12 horas diárias.

Protocolo de anestesia dos animais

No pré-operatório imediato, cada animal foi pesado para que fosse aplicado o volume ideal de anestésico e medicação pós-operatória. A solução anestésica aplicada pelo médico veterinário foi associação de Ketamina 50mg/Kg e Xilazina 10,0 mg/Kg .

Essa solução foi injetada via intramuscular. Para testar a sensibilidade do animal, antes de iniciarmos o procedimento, foram seguidos procedimentos próprios de avaliação da real efetividade anestésica.

Preparo Cirúrgico dos Animais

Sob anestesia, os animais foram tricotomizados na região lombar, incluindo a região da crista ilíaca e a face lateral dos membros pélvicos. Em seguida, foi feita a antisepsia local com solução de iodo-polvidine para degermação da pele (Figura 16).

A abordagem foi realizada a partir de uma incisão fria retilínea de aproximadamente 3,0 cm, com a divulsão em planos até a exposição do terço proximal do fêmur (Figura 17).

Os leitos receptores consistiram em aberturas na superfície óssea realizadas com trefinas próprias para tais fins, com diâmetro de 4,0 mm e profundidade de 4,0 mm, padronizadas em todos os animais (Figuras 15 a 18) .

Durante o preparo dos leitos, o tecido ósseo foi irrigado com soro fisiológico (solução salina a 5%) com um sistema de bomba peristáltica a 50% para refrigeração do tecido ósseo, evitando dessa maneira um aquecimento acima do limiar de tolerância celular, o qual poderia provocar a necrose dos tecidos e possíveis comprometimentos na regeneração óssea do enxerto.

Uma vez feita a loja óssea, antes da colocação do enxerto ela foi irradiada, e após o preenchimento desta com o osso alógeno particulado hidratado com solução salina a 5%, a loja foi novamente irradiada conforme protocolo estabelecido (Figuras 19 a 20).

O osso femural da pata contralateral foi também enxertado, porém não irradiado com o *laser* de baixa intensidade, sendo considerado como controle.

Terminado o procedimento, os retalhos foram suturados (Figura 23) em planos, tendo sido usado no plano muscular fio Cat Gut cromado, agulhado, 3-0, enquanto na região externa da pele foi usado fio de seda (000) (Figura 21).

Após o término da sutura a região foi limpa com soro fisiológico, sem a necessidade de proteção com curativo (Figura 22).

No período pós-operatório, todos os animais receberam administração de antibiótico à base de enrofloxacina na densidade de energia de 5,0 mg/kg, via intramuscular, bem como analgesia com utilização de cetoprofeno na dose de 20,0 mg/kg, também por via intramuscular por cinco dias seguidos, sempre com supervisão de pessoal capacitado.

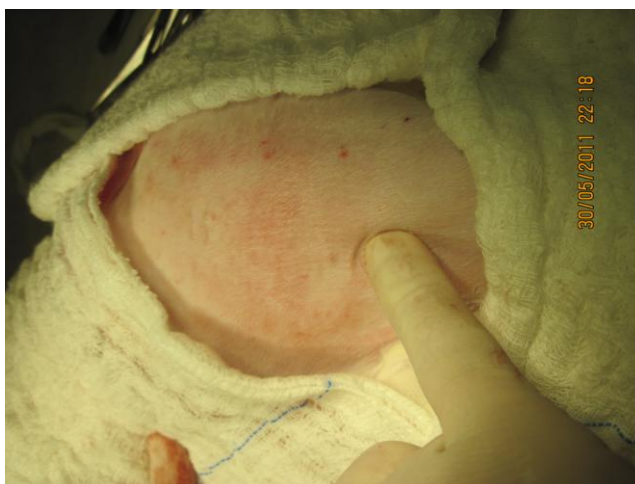


Figura 16 Campo para abordagem cirúrgica



Figura 17 Incisão por planos

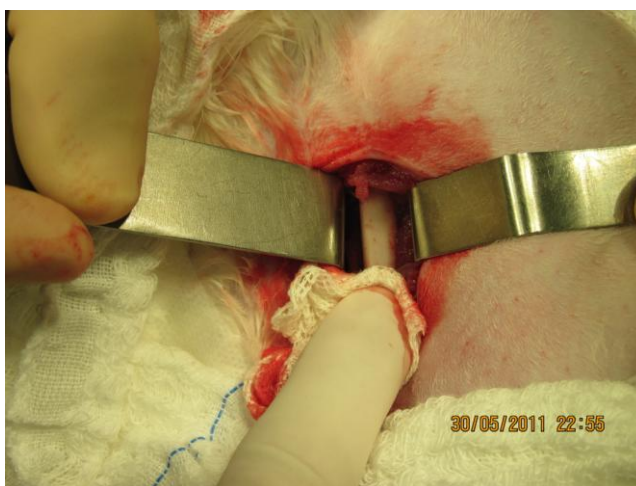


Figura 18 Exposição do tecido ósseo

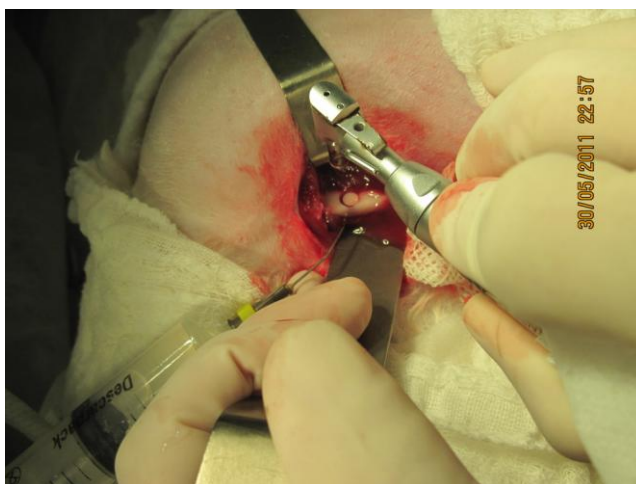


Figura 19 Abertura do alvéolo com trefina



Figura 20 Irradiação com laser de baixa intensidade

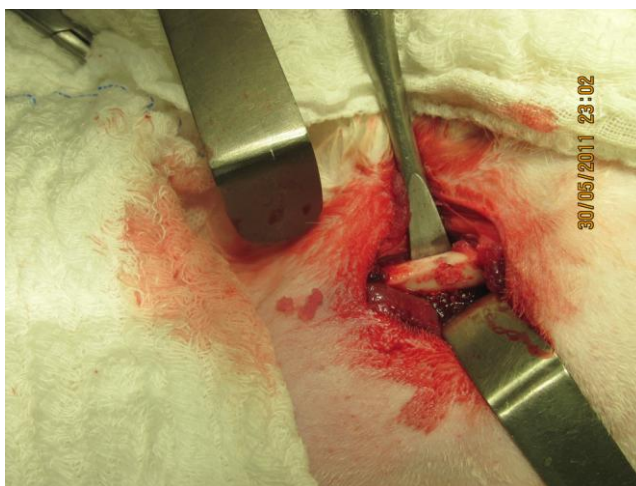


Figura 21 Loja óssea enxertada

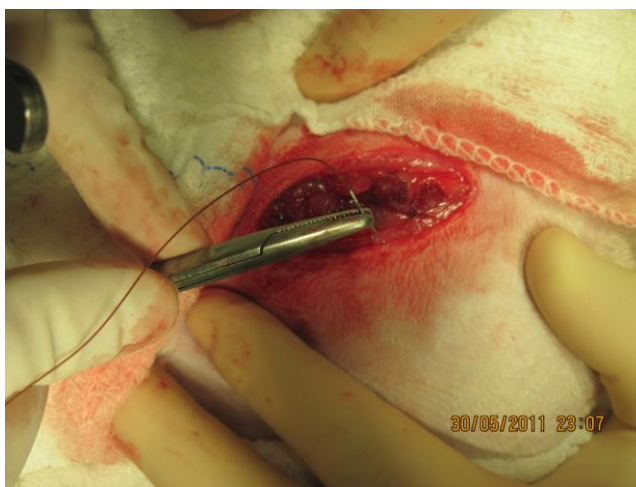


Figura 22 Sutura por planos



Figura 23 Sutura da pele

Protocolo de irradiação

As irradiações foram feitas em contato perpendicular entre a ponta ativa e a ferida cirúrgica, em duas sessões, sendo a primeira logo após o preparo da loja cirúrgica e uma segunda logo após a enxertia. Em cada sessão foi irradiada uma densidade de energia de 7,5 J/cm² em 4 pontos cardenais ao redor da loja cirúrgica, totalizando assim 60 J/cm² em cada irradiação ao final do procedimento cirúrgico.

Foi utilizado um *laser* de diodo de baixa intensidade (Figura 24) com as seguintes características:

Potência: 40 mW

Comprimento de onda: 780 nm

Densidade de energia: 7,5 J/cm²

Área do feixe: 4 mm²

Modo de irradiação: 4 pontos cardenais

Tempo de irradiação por ponto: 7,5 s (monitorado por cronômetro)

Cálculo da densidade de energia:

$$D \text{ (J/cm}^2\text{)} = \frac{t \text{ (s)} \times P \text{ (W)}}{A \text{ (cm}^2\text{)}}$$



Figura 24 Laser de Baixa Intensidade

O objetivo principal desta dissertação foi o estudo da incorporação de enxertos ósseos alógenos em leitões receptores feitos em fêmures das amostras em associação às Irradiações com *Laser* de Baixa Intensidade.

Foram usados 33 coelhos, porém três dos animais morreram, um por causas diversas associadas ao manejo cirúrgico e os outros dois animais por um aprofundamento gradual da anestesia até o óbito, restando 30 animais que foram operados e mantidos vivos até a coleta das amostras para análise. Nenhuma outra intercorrência, além das descritas acima, foi verificada em todo o experimento, como infecções, deiscência de suturas, fraturas de fêmures ou algo que pudesse interferir no trabalho ou nos resultados achados.

Em seguida, os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos de acordo com o tempo de sacrifício para a coleta das amostras para o preparo das lâminas:

Grupo I: Eutanásia realizada 10 dias após a cirurgia.

Grupo II: Eutanásia realizada 20 dias após a cirurgia.

Grupo III: Eutanásia realizada 30 dias após a cirurgia.

4.1.3. Eutanásia dos animais

A metodologia de eutanásia empregada em todos os grupos experimentais consistiu no uso da substância química pentobarbital sódico na dose de 150 mg/kg, via intravenosa, na veia marginal da orelha dos coelhos.

A aplicação de droga anestésica excessiva foi o método de escolha para a eutanásia dos animais; porém, quando não havia resposta satisfatória, foi aplicada a Ketamine 250mg intracardíaca, com os animais sob efeitos de anestesia geral.

A constatação da morte foi feita pela ausência de expansão torácica e dos batimentos cardíacos, bem como pela ausência de reflexo palpebral e midríase.

Após a coleta dos tecidos, os animais foram descartados em sacos plásticos especiais, segundo critérios estabelecidos pela Comissão de Gerenciamento de Resíduos Hospitalares da FMUSP, de acordo com o controle de zoonose estabelecido pela Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo, segundo protocolo padrão de manuseio de material biológico para incineração como lixo hospitalar.

Remoção das peças para estudo

Após a constatação da morte dos animais, foi feita a degermação e a colocação de campos cirúrgicos estéreis. A pele foi incisada até a exposição do tecido celular subcutâneo. Em seguida, os planos de tecido mole foram incisados, expondo o tecido ósseo até alcançar a cabeça do fêmur onde foi inserido o enxerto.

A peça cirúrgica para análise foi removida com extensão de segurança, abrangendo da cabeça do fêmur até a região média da diáfise do fêmur, a qual foi esqueletizada para uma melhor adequação do material.

Imediatamente à sua remoção, as peças foram identificadas e imersas em formaldeído a 7,4%, para fixação por 72 horas, e enviadas a um laboratório para a descalcificação das peças e o processamento do material para a confecção das lâminas histológicas.

4.1.4. Processamento histotécnico para confecção das lâminas

Cessado o prazo de fixação das peças, estas foram imersas em solução de EDTA tetrassódico 7% pH 7,2 para iniciar o processo de descalcificação durante 60 dias. Em seguida, as peças foram incluídas formando em parafina formado os blocos para o preparo das lâminas, as quais foram obtidas a partir de secções transversais do tecido ósseo receptor para a visualização do enxerto, do tecido medular e da cortical. As lâminas foram preparadas com hematoxilina-eosina (H-E) para um estudo histomorfológico comparativo entre o tecido enxertado, irradiado com o *laser* de baixa intensidade, e o tecido não irradiado.

A análise histomorfológica foi realizada sob microscopia de luz no Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ da USP, num aparelho NIKON ECLIPSE modelo E 800, e a captação das imagens foi feita pela câmera Media CIBERNETICS, modelo COOL SNAP-Prof.

5. RESULTADOS

A análise histomorfológica foi realizada sob microscopia de luz, sendo avaliados os seguintes eventos histomorfológicos, comparativamente entre os grupos irradiados e não irradiados:

- Angiogênese
- Presença de osteoblastos
- Presença de osteócitos
- Osso neoformado

Os resultados foram avaliados por meio de uma contagem quantitativa com o uso do Retículo de Weibel, que quantifica as células próprias do osso, os vasos presentes e o tecido neoformado. Nesse tipo de quantificação são examinados 10 campos de cada lâmina, em que se faz a contagem para posterior análise histomorfométrica, em cada cruzamento das linhas deste grid.

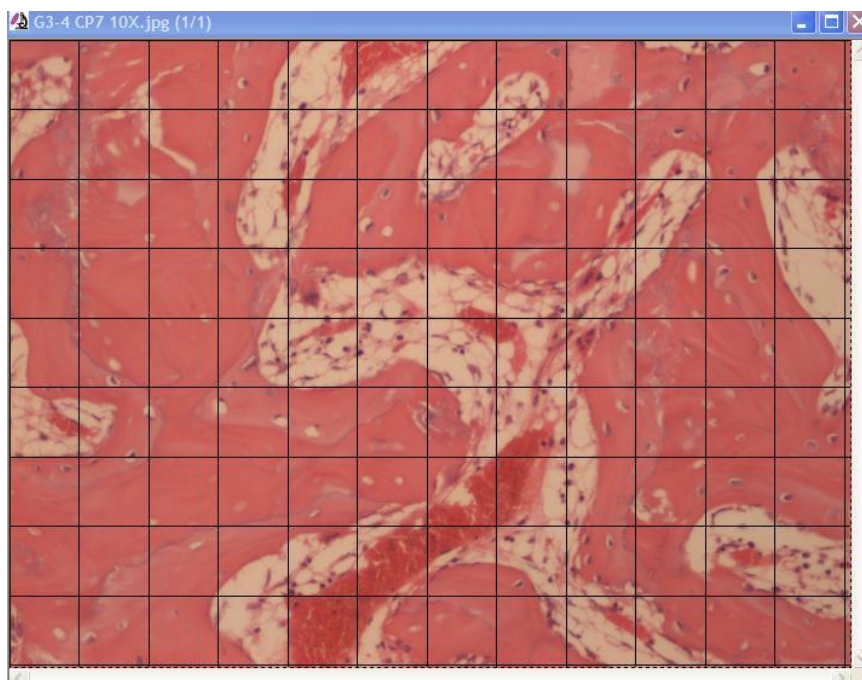


Figura 25 Retículo de Weibel

Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste One-way ANOVA para comparar os grupos com os eventos avaliados com um nível de significância $p \leq 0,05$ (Gráfico 1).

Estudos para comparar grupos de tecido ósseo irradiados e não irradiados como neste experimento têm sido descritos por diversos autores, enquanto outros estudos têm feito comparação com grupos placebos com uso de luz comum não *laser*.

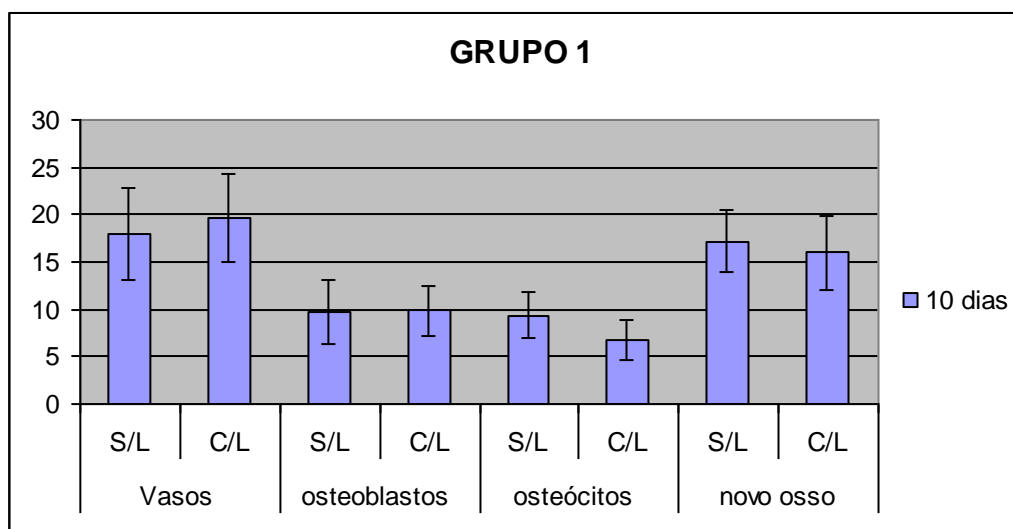


Gráfico 1 – Resultados estatísticos – GRUPO 1

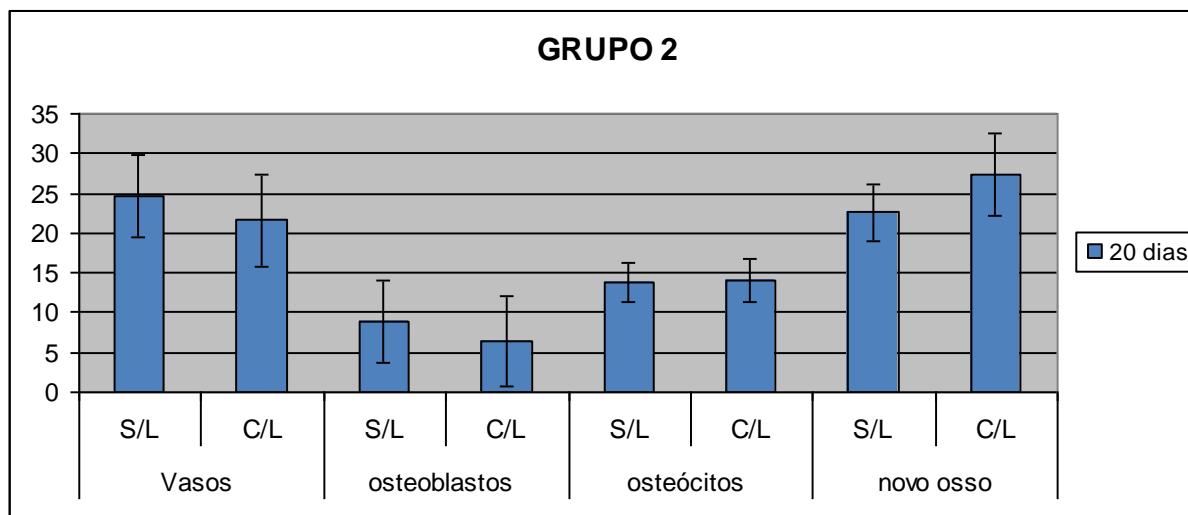


Gráfico 2 – Resultados estatísticos – GRUPO 2

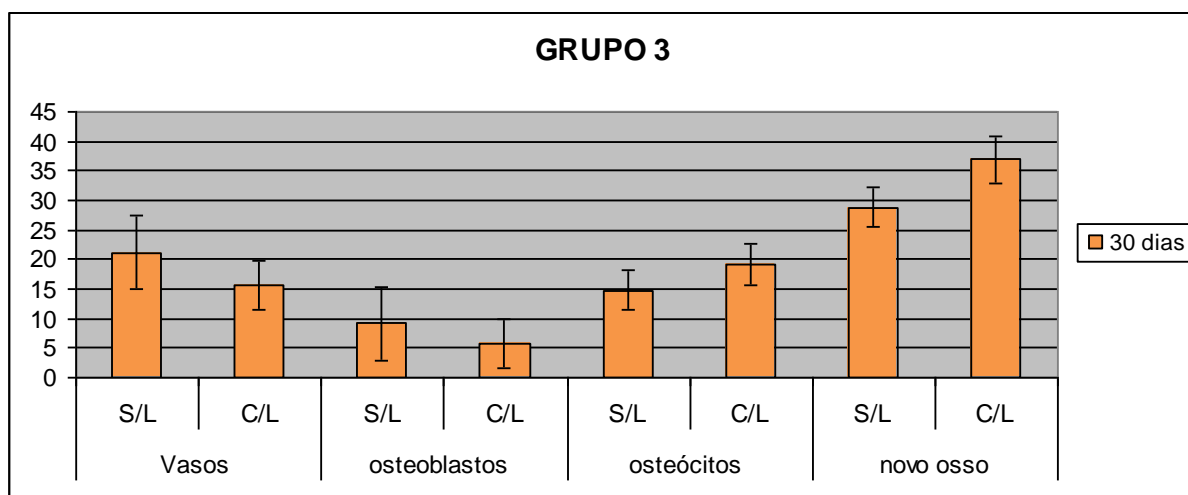


Gráfico 3 – Resultados estatísticos – GRUPO 3

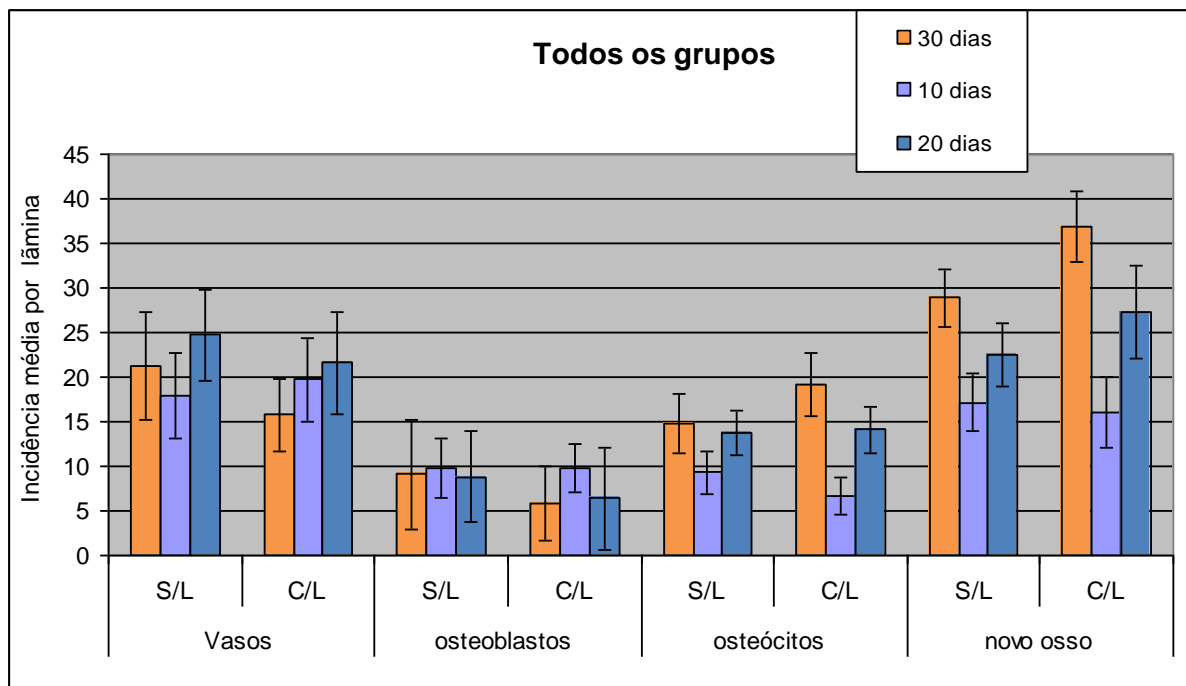


Gráfico 4 – Resultados estatísticos – TODOS OS GRUPOS

Achados histológicos

As avaliações histológicas mostraram processos normais de cura em todos os grupos, irradiados ou não, sem patologias importantes que pudessem mudar os resultados deste experimento.

Grupo 1 – Eutanásia com 10 dias

Observou-se nas lâminas do Grupo 1 não irradiado, ou seja, animais eutanasiados nos primeiros 10 dias, uma grande angiogênese na região do enxerto, com proliferação de osteoblastos junto a um tecido ósseo imaturo, não apresentando sinais de infiltração inflamatória nem rejeição do tecido.

A matriz oriunda do enxerto mostrou-se circundada por osteoblastos, com a presença de osteoclastos em menor número, e uma formação inicial de matriz óssea já com a presença de osteócitos.

O tecido enxertado caracteriza-se por apresentar grande número de lacunas ou osteoplastos vazios, que foram povoados por osteócitos ao mesmo tempo que um tecido ósseo aposicional ao enxerto foi se formando.

Ocorreram em algumas áreas a reabsorção do tecido ósseo enxertado e a substituição por tecido ósseo neoformado aposicional ao enxerto.

A medular do tecido ósseo onde foi colocado o enxerto é caracterizada pela presença de células hematopoiéticas, hemácias nucleadas com algumas células em fase de mitose. Observou-se também tecido conjuntivo frouxo com discreto infiltrado inflamatório, não significativo nesta fase da reparação, uma vez que uma resposta inflamatória discreta é vista como parte da própria reparação perante o trauma cirúrgico da colocação do enxerto (Figuras 26 e 27).

O Grupo 1 que teve seus tecidos irradiados apresentou comportamento semelhante ao do grupo não irradiado, porém observou-se uma maior angiogênese no grupo irradiado quando comparado ao grupo não irradiado.

A presença de osteoblastos significativamente maior, uma densidade maior de tecido ósseo neoformado, foi também observada. Aparentemente havia também uma maior quantidade de osteoclastos com diferentes formatos e tamanhos. Observa-se também a presença de muitos osteoblastos (Figuras 28 e 29).

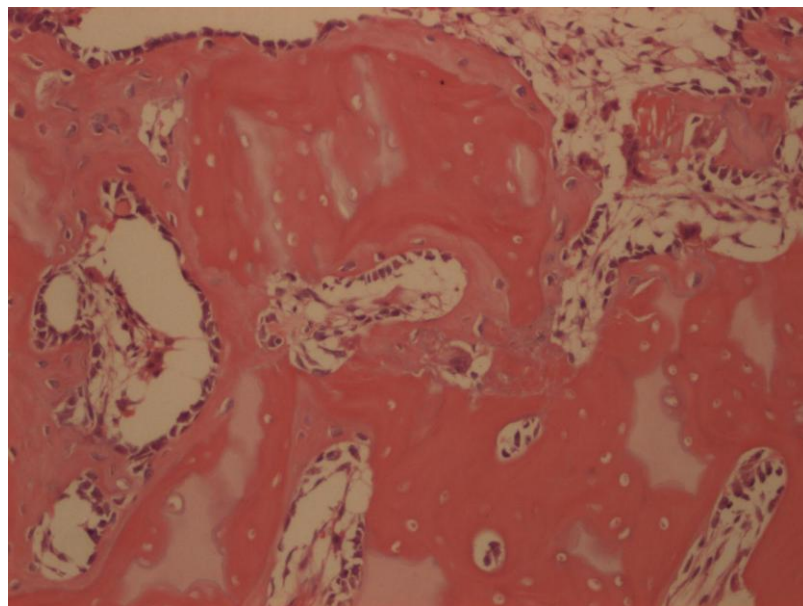


Figura 26 GRUPO 1 – Presença de lacunas, osteoblastos, vasos e tecido ósseo neoformado HE 100X

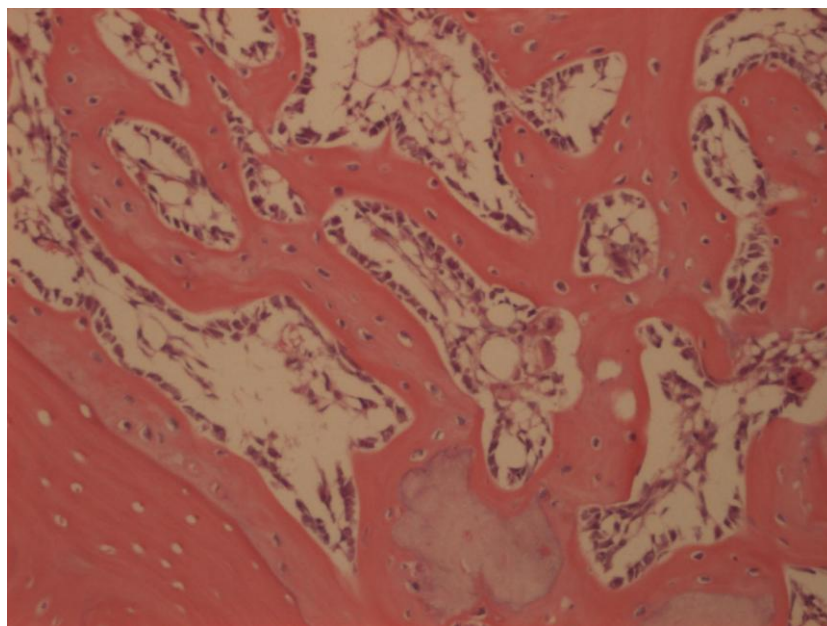


Figura 27 GRUPO 1 – Presença de osteoblastos, vasos, enxerto ósseo e osso neoformado

HE 100X

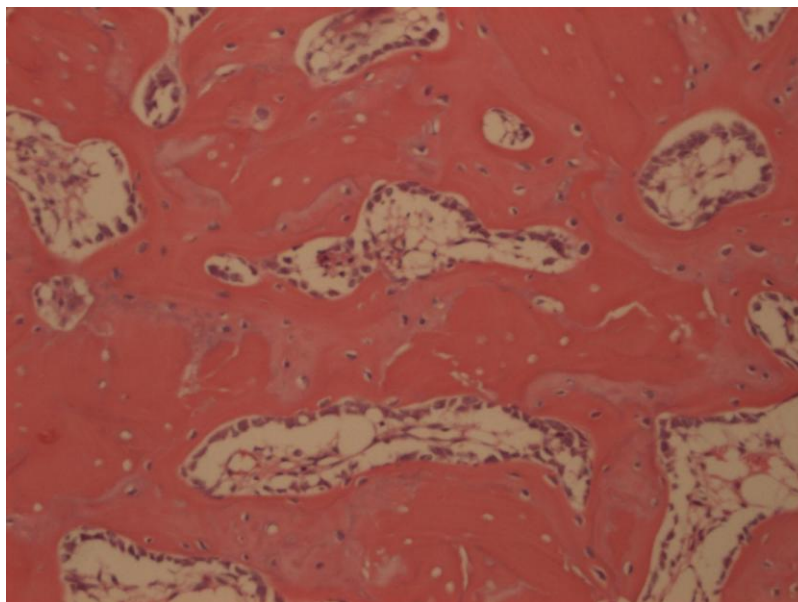


Figura 28 GRUPO 1 IRRADIADO – Material do enxerto, vasos, osteoblastos e tecido ósseo neoformado HE 100X

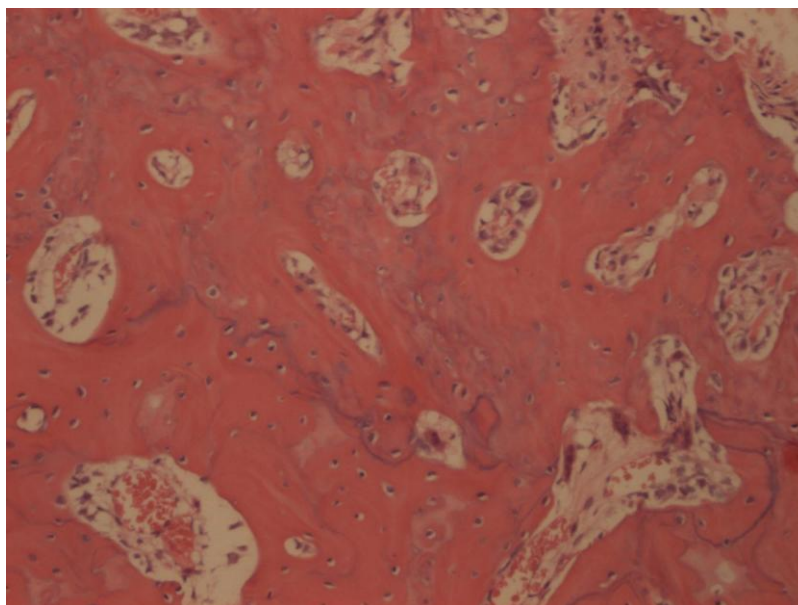


Figura 29 GRUPO 1 IRRADIADO – Presença de poucas lacunas, tecido ósseo organizado com a presença de osteócitos HE 100X

Grupo 2

As lâminas do Grupo 2 com tecido enxertado não irradiado (Figuras 30 e 31) apresentaram uma diminuição da quantidade de vasos, uma diminuição da quantidade de células osteoblásticas e, embora a região apresentasse um tecido ósseo neoformado organizado apondo-se ao enxerto, este ainda mostrou grande quantidade de lacunas vazias não povoadas pelos osteoblastos.

Alguns vasos neoformados invaginavam através do enxerto, o que demonstra uma incorporação do enxerto ao leito receptor, com uma matriz óssea irregular que demonstrou uma neoformação mais lenta.

Os tecidos enxertados e irradiados mostraram um ganho na neoformação óssea, com a presença de osteócitos, células estas presentes no tecido ósseo maduro.

A presença de vasos com menor calibre no enxerto foi maior no tecido irradiado; uma quantidade menor de lacunas também foi observada, o que mostra uma maior incorporação do enxerto através do povoamento com osteócitos (Figuras 32 e 33).

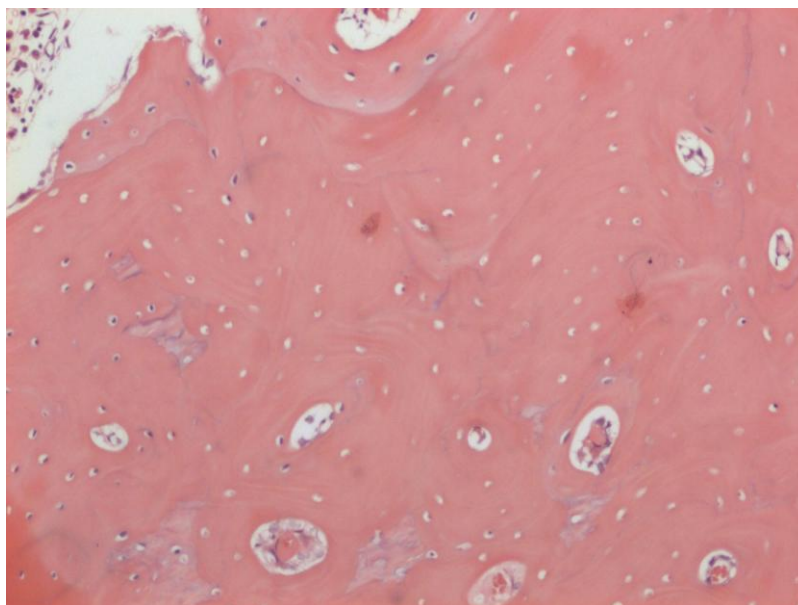


Figura 30 GRUPO 2 NÃO IRRADIADO – Grande número de lacunas, com aposição de novo osso e presença de vasos no enxerto HE 100X

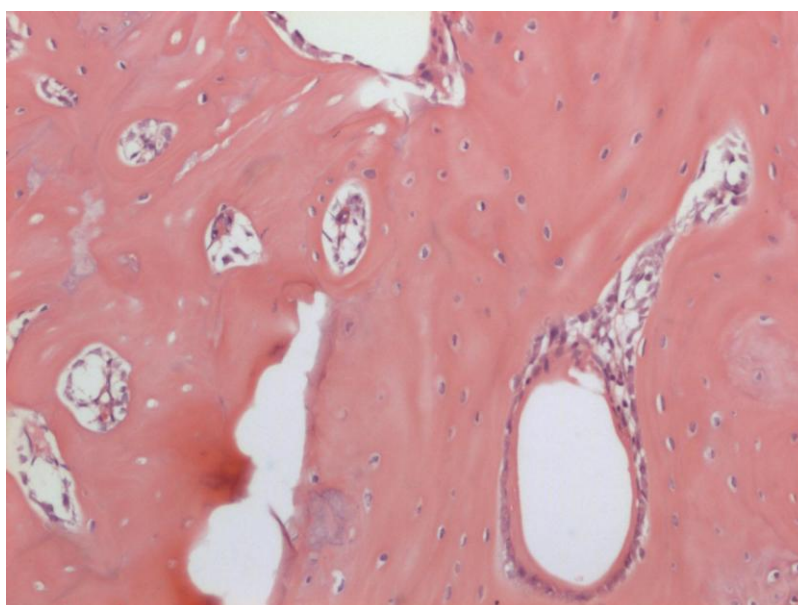


Figura 31 GRUPO 2 NÃO IRRADIADO – Lacunas vazias e preenchidas com osteócitos, vasos HE 100X

Nas lâminas do Grupo 2 irradiado observou-se pelas imagens uma deposição óssea regular e mais intensa com um nível de maturação óssea maior que o do grupo não irradiado. Foi encontrado um número significativo menor de lacunas, com um diminuição acentuada de vasos sanguíneos.

O tecido ósseo apresentou pequenos vasos em seu interior, representando um Canal de Havers, em uma osteona em formação.

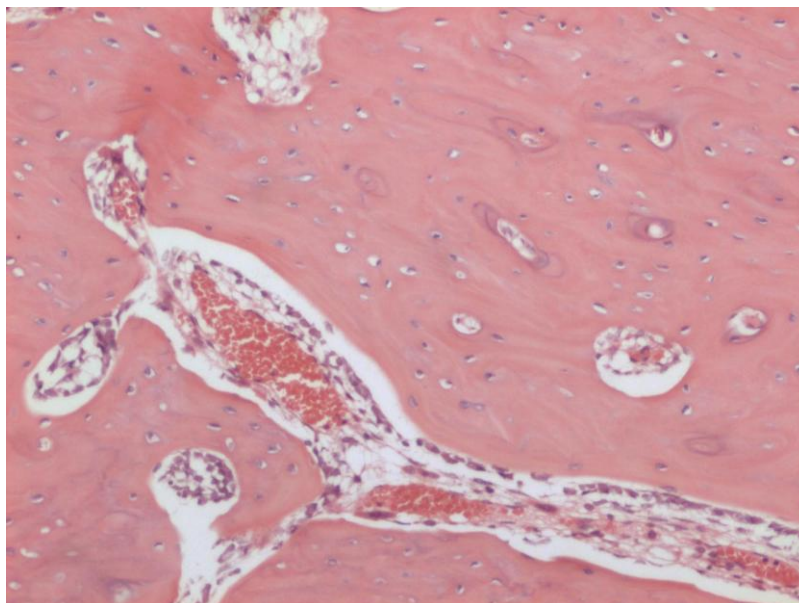


Figura 32 GRUPO 2 IRRADIADO – Aposição e incorporação do enxerto

HE 100X

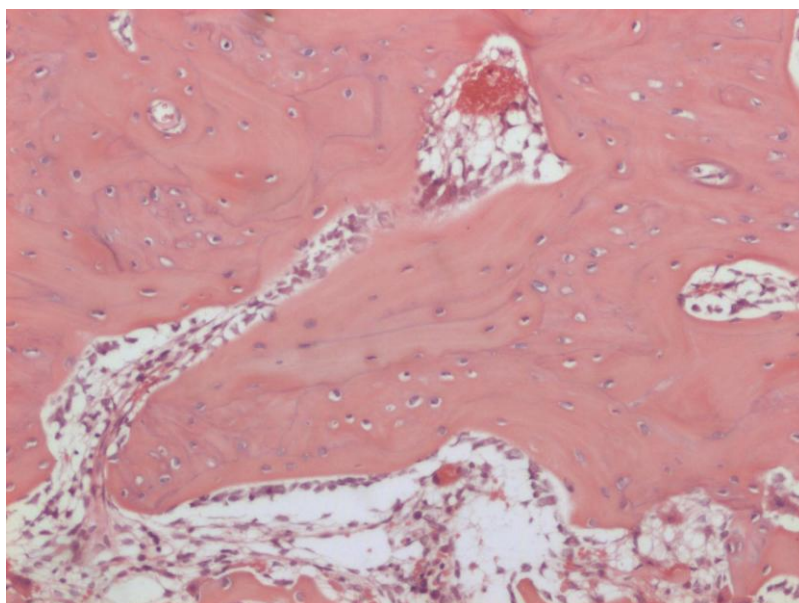


Figura 33 GRUPO 2 IRRADIADO – Aposição e incorporação do enxerto

HE 100X

Grupo 3

Neste grupo observou-se a incorporação do enxerto nos tecidos irradiados, porém o enxerto apresentava grande número de osteócitos, com uma quantidade significativa de osso neoformado.

Os tecidos não irradiados (Figuras 34 e 35), muito embora estivessem incorporados, apresentando tecido ósseo neoformado, continham lacunas vazias, significando que não houve até aquele momento uma invasão de osteócitos caracterizando uma completa incorporação do enxerto.

Nos tecidos irradiados foi observado um tecido ósseo com suas lacunas apresentando osteócitos no seu interior, algumas vazias; o tecido ósseo neoformado aportado ao lado do enxerto não apresentou solução de continuidade com características de um tecido incorporado ao enxerto.

Os tecidos irradiados (Figuras 36 e 37) comparativamente ao grupo controle não apresentaram diferenças significativas quando observados os vasos sanguíneos, o que sugere uma osteointegração do enxerto.

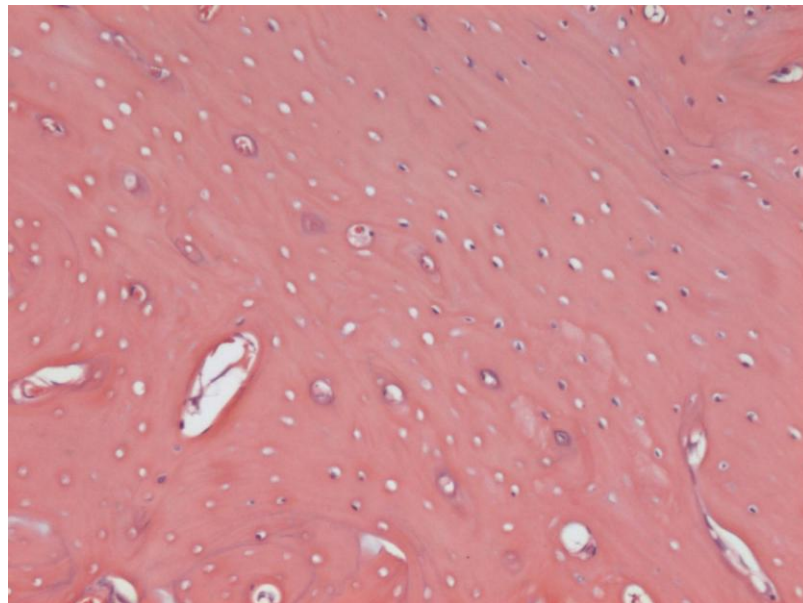


Figura 34 GRUPO 3 NÃO IRRADIADO – Tecido ósseo incorporado ao enxerto, presença de lacunas HE 100X

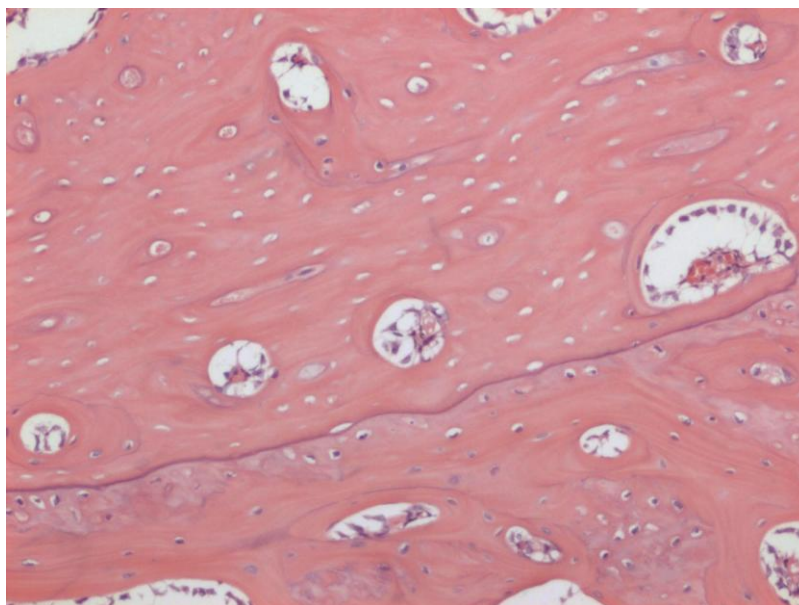


Figura 35 GRUPO 3 NÃO IRRADIADO – Tecido ósseo neoformado aposicionado ao enxerto

HE 100X

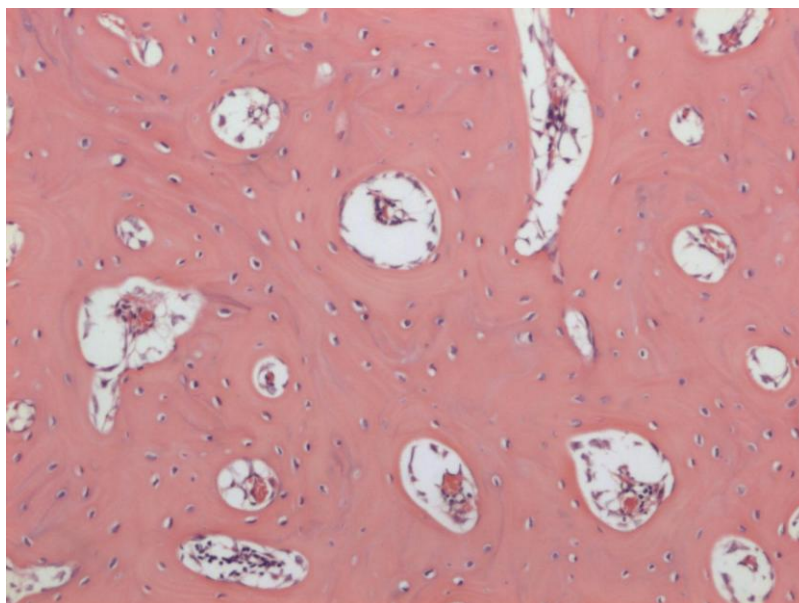


Figura 36 GRUPO 3 IRRADIADO – Enxerto ósseo incorporado sem a presença de lacunas

HE 100X

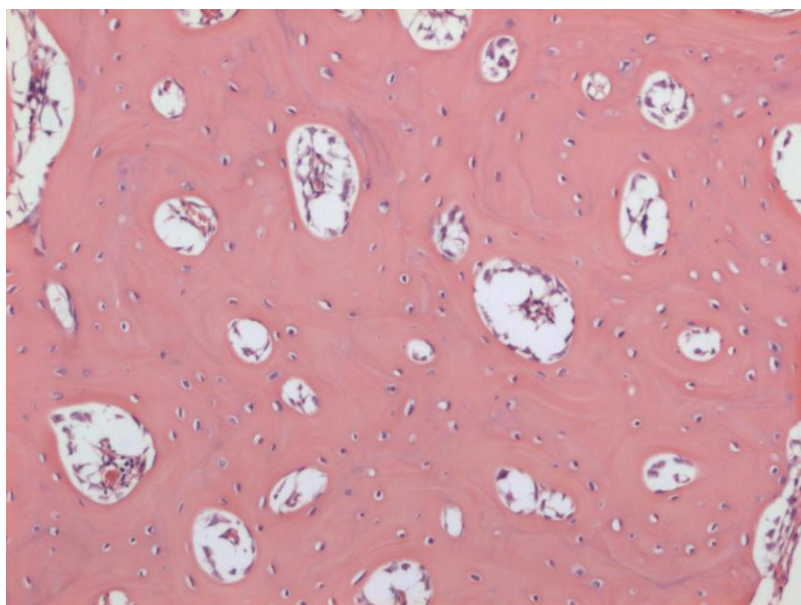


Figura 37 GRUPO 3 IRRADIADO – Enxerto incorporado com presença de vasos

HE 100X

6. DISCUSSÃO

Os enxertos são considerados uma realidade clínica quando se necessita reabilitar a região da maxila e da mandíbula, que sofreram perda crescente e progressiva do tecido ósseo após a perda do órgão dental, necessitando portanto de implantes dentais^{4 5}.

Apesar do uso frequente desta modalidade de tratamento, a literatura se mostra escassa no que tange os estudos da osseointegração do enxerto, seja ele autógeno, ou alógeno junto ao leito receptor do paciente. Em geral está embasada em observações clínicas com pouca discussão sobre os fenômenos biológicos que ocorrem com estes resultados^{2 3}.

Pesquisadores recentemente desenvolveram protocolos cirúrgicos com o objetivo de otimizar a osseointegração do enxerto junto ao leito receptor, com fundamentos biológicos e científicos para que este tenha uma quantidade de tecido ósseo suficiente para a colocação dos implantes, e com uma qualidade de tecido enxertado que suporte as cargas mastigatórias. A reabsorção óssea segue um padrão semelhante entre os pacientes, porém a qualidade de tecido ósseo remanescente varia entre os indivíduos, o que faz com que os planejamentos para reabilitação com implantes dentários sejam variáveis^{5 6 7}.

Em virtude destas condições que variam de paciente para paciente os enxertos ósseos se tornam uma opção de tratamento para melhorar os resultados das reabilitações. Por isso, a preocupação em estudar os resultados dos diferentes tipos de enxertos no organismo, avaliando os resultados inerentes a cada um.

O enxerto de eleição é o autógeno, que traz todas as células e material orgânico do próprio paciente, com propriedades osteoindutoras e osteocondutoras^{17 18 22}, sendo a melhor opção clínica e biológica, mas com limitações na quantidade e com uma grande morbidade ao paciente¹⁹.

O uso do osso alógeno facilita e simplifica o procedimento cirúrgico uma vez que elimina um segundo procedimento de captação do osso de uma região doadora, diminuindo a morbidade do ato cirúrgico para o paciente.

Na necessidade de uma grande quantidade de material para enxerto, o osso alógeno consegue resultados muito semelhantes aos dos enxertos autógenos, uma

vez que este mantém os requisitos para a sua osseointegração, por meio da manutenção da osteogênese, osteoindução e osteocondução^{21 22 23 24}.

O enxerto alógeno segue os mesmos estágios de incorporação ao leito receptor, mas de uma forma mais lenta, uma vez que este tecido não possui o mesmo potencial indutor do tecido autógeno e mostra uma menor capacidade de revascularização²⁵, que entretanto não se observou em nossa pesquisa, visto que o exame histológico nos três grupos manteve um nível de vascularização semelhante estatisticamente, porém mais pronunciado nos enxertos irradiados do que no controle.

Os enxertos alógenos podem se apresentar de várias formas para seu uso, como criopreservado e fresco; congelado e seco; ou como uma matriz óssea desmineralizada^{29 30 31}.

Para o experimento em questão usamos o enxerto ósseo alógeno particulado fresco congelado, que começou a substituir o enxerto autógeno nos anos 1980, pois apresenta uma menor morbidade no ato cirúrgico e um bom prognóstico, sem apresentar toxicidade local ou sistêmica, resultando numa incorporação biológica efetiva sobre o leito receptor³³.

Esses enxertos não trazem riscos de doenças pois são processados por bancos de tecidos que obedecem às normas do *The American Association of Tissue Banks* de 1977, assegurado por meio de exames sorológicos e de cultura que o receptor esteja seguro contra a contaminação de infecções virais como hepatite B, C e HIV^{38 39}, apresentando menores riscos que aqueles que ocorrem com a transfusão sanguínea⁴¹.

Neste estudo, os tecidos coletados foram processados de acordo com as normas seguidas pelos bancos de tecidos, ou seja, a limpeza incluiu a esqueletização, a lavagem com soro fisiológico, os banhos com peróxido de hidrogênio e em seguida foram congelados a baixas temperaturas, -80°C ⁴², até a sua liberação para o uso.

As características osteoindutoras do enxerto alógeno se congelado e fresco são mantidas, porém o potencial osteoindutor maior ou menor está relacionado com a forma pela qual este enxerto foi processado³¹, significando que estes tecidos poderão apresentar uma osteoindução e imunogenicidade ausentes ou diminuídas. Essa diminuição da antigenicidade está diretamente relacionada com o processamento do tecido ósseo que recebe lavagens com peróxido de hidrogênio,

que diminui o tecido gorduroso da sua porção medular, além da manutenção em freezers em temperaturas que promovem a necrose celular.

O tecido fresco mantém o material orgânico na sua estrutura, mas quando congelado, alguns osteócitos morrem, deixando as lacunas, ou osteoplastos, vazias, além de uma desorganização do colágeno e uma desnaturação protéica responsável pela resposta osteoindutora e imunogênica⁴⁷.

Aho, A. J. et al. (1998) em seus estudos não observaram reações alérgicas significativas, rejeição, nem nenhuma reação antigênica em transplantes alógenos frescos e congelados, em comparação aos congelados e secos, nos quais não há vascularização nem células vivas do doador⁶⁰.

Há dois estudos que relatam casos de imunização pelo Fator Rh em mulheres que receberam enxertos alógenos frescos e criopreservados, sugerindo que essas mulheres devem receber enxertos de doadores também Rh negativo⁶¹.

No Brasil, são sete os bancos de tecidos de músculos esqueléticos autorizados pelo SNT-MS para captar, processar, armazenar e distribuir os tecidos de doadores vivos ou falecidos no país, para profissionais qualificados, habilitados e cadastrados no SNT-MS.

O número de transplantes ósseos na odontologia representa 30% dos que são realizados nos diversos tipos de cirurgia.

Neste experimento os enxertos foram captados, processados e criopreservados segundo os critérios usados nas captações de tecidos humanos, pois este experimento avaliou a osseointegração do enxerto ao leito receptor^{66 67}. Portanto, esta pesquisa reproduziu uma situação da prática diária dos cirurgiões-dentistas, e pode ser considerada como uma contribuição científica para um melhor entendimento da osseointegração do enxerto alógeno processado e tratado previamente, oriundo de banco de tecidos.

Os resultados deste estudo demonstraram uma integração dos enxertos alógenos nos seus respectivos leitos receptores, sem uma resposta imunogênica clinicamente observável que comprometesse a saúde dos animais, pois não houve rejeição dos enxertos.

A irradiação com o *laser* foi introduzida neste experimento considerando os estudos prévios que mostraram uma melhora no reparo de cicatrização óssea^{95 96}, pois a aceleração na formação de tecido ósseo após a irradiação com *laser* de baixa intensidade tem sido foco de muitas pesquisas, muitas delas baseadas em achados

clínicos ou estudos feitos em modelos experimentais *in vivo*⁹². Neste estudo, foram avaliados os eventos que ocorrem neste microambiente nas diversas fases da reparação, em enxertos alógenos particulados colocados em fêmures de coelhos e irradiados com *laser* de baixa intensidade, infravermelho, 780nm. O efeito fotobiomodulador desse *laser* no infravermelho próximo ocorreu devido à sua capacidade de penetração nos tecidos biológicos, em até dois milímetros, antes de perder algum percentual de energia; isso é uma clara indicação para irradiação em tecido ósseo.

O efeito biomodulador do *laser* de baixa intensidade ocorre pela ação sobre os processos moleculares e bioquímicos além da sua capacidade de analgesia e anti-inflamatória, estimulando a microcirculação e otimizando a reparação tecidual.

Pesquisas atestam que o *laser* de baixa intensidade promove a bioestimulação das células, melhora a capacidade de regeneração óssea por um processo ainda não totalmente esclarecido, e cuja densidade de energia de irradiação para este fim ainda é controversa e não possui protocolos definidos^{80 83}.

Muitos autores preconizam seus próprios protocolos de irradiação, Pinheiro et al. (2003) recomendam uma densidade de energia de 5 J/cm² em reparos de tecido ósseo, mas que podem variar de 1,8 a 5,4 J/cm²¹⁰³.

Em outros estudos as irradiações usadas de 3,4 J/cm² por 3 vezes na semana foram benéficas para a osseointegração de implantes dentários⁸⁴. Outro estudo observou a reparação de defeitos em tíbias de ratos com densidade de energias variadas de 3,15 J/cm², 31,5 J/cm² e 94,5 J/cm² com resultados semelhantes⁸⁵.

Nesta pesquisa o protocolo de irradiação de 7,5J/cm² feita em 8 sessões pontuais apenas no transoperatório mostrou-se efetivo, uma vez que os resultados mostraram uma aceleração na reparação óssea, quando comparamos grupos irradiados e não irradiados.

A irradiação do leito receptor antes e imediatamente depois da colocação do enxerto nos estágios iniciais da reparação aumentou o estímulo à formação óssea quantitativamente, em decorrência da atuação do *laser* de baixa intensidade, o que pode ser observado em todos os grupos estudados ($p < 0,002$), em que se observa a atuação do *laser* de baixa intensidade em processo de estágios proliferativos, precoces da diferenciação celulares e em estágios tardios⁸⁷.

O efeito da laserterapia é mais eficaz nos estágios iniciais, quando a proliferação celular é mais elevada. A ativação da primeira fase da incorporação do enxerto, a

angiogênese, eleva os níveis de oxigênio, e são condições importantes pois representa a fase inicial deste processo^{25 26}.

O Grupo 1 (eutanásia de 10 dias) apresentou uma acentuada neoformação de vasos, porém com uma quantidade maior no grupo irradiado, ou seja, houve uma aceleração na angiogênese no grupo que recebeu terapia com *laser*, que mantém os níveis efetivos de oxigênio nos tecidos enxertados.

Numa observação do Grupo 2 (20 dias de eutanásia) e Grupo 3 (30 dias de eutanásia) temos como resultado uma diminuição da angiogênese principalmente nos Grupos 2 e 3 irradiados ($p < 0,002$), o que demonstra que os níveis de oxigenação dos tecidos enxertados foram alcançados com maior rapidez, provocando uma inibição na angiogênese uma vez que os níveis de gradiente de oxigênio haviam sido alcançados.

Com o aumento do gradiente de oxigênio, ocorre a criação de um mecanismo que previne uma angiogênese acentuada, por reversão da hipóxia local, e diminui-se a ação dos macrófagos na liberação de fatores de crescimento e fator de angiogênese para evitar uma resposta indesejável como a hiperplasia, e espera-se uma diminuição destes números de vasos para que se processe a segunda fase da incorporação do tecido enxertado.

Observamos nos resultados comparativos entre os Grupos 1, 2 e 3 irradiados ($p < 0,002$) e nos resultados entre grupos não irradiados ($p < 0,001$) uma diminuição da quantidade de vasos nas fases subsequentes da incorporação, porém com uma resposta mais evidente de aceleração destes processos nos tecidos irradiados.

Os osteoblastos nos estágios iniciais da reparação são responsáveis pela produção de fosfatase alcalina que dá origem aos nódulos de mineralização^{25 99}. Este fenômeno foi claramente observado no Grupo 1 (eutanásia de 10 dias) deste experimento, tanto nas medidas estatísticas como pelos cortes histológicos, que mostraram a presença de muitos osteoblastos juntamente com vasos, porém com número significativamente maior no grupo irradiado ($p < 0,001$).

A estimulação de células principalmente de linhagem osteoblástica e a aceleração na diferenciação celular resultam numa maior e mais rápida neoformação óssea que ocorre no início da reparação^{98 99}.

Nos Grupo 2 (eutanásia de 20 dias) e Grupo 3 (eutanásia de 30 dias) temos um resultado representado com uma diminuição de osteoblastos nos grupos irradiados, com acentuada diminuição deste fenômeno à medida que aumenta o tempo do

experimento ($p < 0,0001$), o que demonstra uma aceleração na mineralização destes tecidos, uma vez que comparativamente o número de osteócitos ($p < 0,0001$) aumenta proporcionalmente, mostrando que estes osteoblastos tiveram sua matriz orgânica mineralizada transformando-se em osteócitos nas suas respectivas lacunas.

Neste estudo a incorporação do enxerto se traduz em osso neoformado aqui representado pelo número de osteócitos.

As evidências estatísticas encontradas mostram que o enxerto alógeno contribui com segurança para ganhos de tecido ósseo com intuito de tornar possíveis as reabilitações com implantes dentários, mas quando estes enxertos foram irradiados observou-se uma aceleração do processo de reparação, com uma adequada adesão do enxerto ao leito receptor em todos os grupos estudados ($p < 0,0001$).

Esta irradiação sequencial preconizada por alguns autores muitas vezes torna-se inviável ao paciente submetido a cirurgias de enxertos, pela morbidade do ato cirúrgico que dificulta a sua locomoção, abertura de boca para a irradiação do local operado, e muitas vezes pela sua locomoção até o consultório.

Baseamos nosso estudo nos quatro parâmetros da incorporação óssea, sendo o primeiro a revascularização do tecido enxertado, e tivemos como resultado um aumento da quantidade de vasos nos grupos irradiados numa comparação entre grupos ($p < 0,001$)

Todos os grupos irradiados ou controles apresentaram lacunas vazias em todo experimento, apenas no Grupo 3 as características de maturação do enxerto ficaram mais evidentes, sem lacunas vazias e com um grande aporte de osso novo incorporado ao enxerto, em concorde com os trabalhos de Pinheiro e Gerbi em 2006 sobre os benefícios da irradiação no infravermelho em cultura de células osteoblásticas, com aumento da deposição de colágeno e neoformação óssea.

O exame histológico revelou que a angiogênese, a proliferação e a diferenciação de células osteogênicas foram mais pronunciados no grupo irradiado.

No experimento observou-se a benéfica atividade biológica após a irradiação do tecido enxertado em uma única sessão do transoperatório em todos os grupos deste experimento.

Alguns autores⁸⁴⁸⁵ não conseguiram demonstrar os efeitos benéficos da irradiação com *laser* de baixa potência, mas eles são vistos com cautela uma vez

que estes resultados podem ter sido obtidos em função de um pequeno número de animais usados em seus experimentos.

Nesta pesquisa a escolha de uma única sessão de irradiação de *laser* no transoperatório num contato direto com a ferida cirúrgica, diferentemente de outros estudos que propõem múltiplas irradiações transcutâneas, foi para demonstrar o potencial de reparo dos tecidos após uma única irradiação que poderá se tornar um novo protocolo clínico de irradiação.

7. CONCLUSÕES

Os enxertos alógenos frescos e congelados mostraram-se efetivos sendo inteiramente incorporados ao leito receptor, não havendo nenhum tipo de resposta inflamatória imediata ou tardia nem fibrose evidente em nenhum dos grupos estudados neste experimento.

Com base nos parâmetros usados e nos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que a irradiação *laser* num comprimento de onda de 780nm otimizou o processo de reparação óssea e incorporação do enxerto alógeno.

A irradiação em sessão única no transoperatório trouxe maior aporte de células osteogênicas e vasos nos tecidos irradiados, fatores importantes para que ocorram a incorporação do enxerto e a neoformação óssea.

A irradiação única no transoperatório poderá ser uma modalidade de tratamento a ser adotada na clínica pela praticidade e pelo conforto que traz ao paciente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 MAIOR, B.S.S. Efeito da terapia *laser* de baixa intensidade associada a enxertos ósseos liofilizados bovinos no processo de reparação óssea – Estudo conduzido em ratos. Tese (Mestrado), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, 2008.

2 TATUM, O.H. The omni implant system. Proceedings of the Alabama Implant Congress, Birmingham, Ala, May 1988.

3 ATWOOD, D.A.; COY, W.A. Clinical cephalometric and densitometric study of residual ridges, J. Prosthet Dent 26: 280-295, 1971.

4 TALGREN, A. The continuing reduction of the residual alveolar ridges in complete denture wearers: a mixed longitudinal study covering 25 years, J. Prosthetic Dent 27:120-132, 1972.

5 MSCH, C.E. Bone character: second vital implant criterion, Dent Today. 7 (5): 39-40, 1988.

6 LEKHOM, U.; ZARB, G.A. Patient selection and preparation. In: Branemark P-I, Zarb G.A.; Albrektsson T. editors: Tissue integrated prosthesis: osseointegration in clinical dentistry, Chicago, 1985, Quintessence.

7 JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 108 p.

8 MARTIN, R.B.; BURR, D.B.; SHARKEY, N.A. Skeletal biology. In: MARTIN, R.B.; SHARKEY, N.A. Skeletal tissue mechanics. New York: Springer-Verlag. 1998. 29-78.

-
- 9 CATE, R. T. *Histologia Bucal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 108 p.
- 10 POUNTOS, I.; GIANNOUDIS, P.V. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury* 2005; 36 Suppl 3: S 8 –S 12.
- 11 KRAMPERA, M.; PIZZOLO,G.; APRILI,G.; FRANCHINI, M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone*. 2006 Oct; 39 (4): 678-83.
- 12 WU,Y.; WANG, J.F.; SCOTT, P.G.; TREDGET, E.E. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Rep. Reg.* 2007; 15; 18-26.
- 13 BIELBI, R.; JONES, E.; MCGONAGLE, D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone mass. *Injury*. 2007 Mar; 38 Suppl 1: S 26-32.
- 14 KOGIANNI, G., NOBLE, B.S. The biology of osteocytes. *Curr Osteoporos Rep.*2007 Jun; 5 (2): 81-6.
- 15 ROODMAN, G.D. Osteoclast differentiation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1991; 2 (3): 389-409.
- 16 CATE, R.T. *Histologia Bucal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 69 p.
- 17 CHASE, S. & HERNDON, C. The fate of autogenous and homogenous bone grafts: a historical review. *J. Bone Joint Surg.*, 37A: 809, 1955.
- 18 MACEWEN, W. Observation concerning transplantation of bone: illustrated by a case of interhuman osseous transplantation whereby over two thirds of the shaft of a humerus was restored. *Proceedings of the Royal Society of London* 1881;32:232–.
- 19 MISCH, C. E. Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. *Int. J. oral Maxillofac. Imp.*, n. 12, p. 767-76, 1997.

-
- 20 GIANNOUDIS, PV, DINOPOULOS, H, TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. *Injury, International Journal of the Care of the Injured* 2005; 36S:S20–7.
- 21 RABIE, A. B. M.; DAN, Z.; SAMMAN, N. Ultrastructural identification of cells involved in the healing of intramembranous and endochondral bones. *Int. J. oral Maxillofac. Surg.*, v. 25, p. 383-8, 1996.
- 22 CORNELL, C.N., LANE, J. M. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop Rel Res.* 1998; 355S (Suppl): 267-73.
- 23 RABIE, A. B. M.; SAMMAN, N.; HAGG, U. The effect of demineralized bone matrix on the healing of intramembranous bone grafts in rabbit skull defects. *J. dent. Res.*, v. 4, n. 4, p. 1045-51, Apr., 1996.
- 24 BURCHARDT, H. Biology of bone transplantation. *Orthop. Clin. Of North Am.* 1987; 18 (2): 187-96.
- 25 ANDERSON, J. M. The cellular cascades of wound healing. In: Davies, J.E. *Bone engineering*. Toronto: Bone engineering workshop. 1999. 1003-12.
- 26 MARX, R.E.; GARG, A.K. Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clin. Plast.Surg.* 1994 Jul; 21 (3): 377-92.
- 27 KHOURI, R.K., BROWN, D.M., KOUDESI, E.G.; GIGULA, L.A., COOLEY, B.C., Et al. Repair of calvarial defects with flap tissue: role of bone morphogenetic proteins and competent responding tissues. *Plastic and Reconstructive Surg.* 1996; 98 (1): 103-9.
- 28 DAVIES, J.E., HOSSEINI, M.M. Histodynamics of endosseous wound healing. In: DAVIES, J.E. *Bone engineering*. Toronto: Bone engineering workshop; 1999; 1 – .

-
- 29 GARG, A.K. Bone biology, harvesting, and grafting for dental implants. Chicago: Quintessence; 2004. 279p.
- 30 BOYCE, T.; EDWARDS, J.; SCARBOROUGH, N. The influence of processing on safety and performance. *Orthopedic Clin. of North Am.*, 30 (1999) 571-81.
- 31 SHAND, J.M.; HEGGIE, A. A. C.; HOLMES, W. Allogeneic bone grafting of calvarial defects: an experimental study in the rabbit. *Nt. J. of Oral & Maxillofacial Surg.* (2002); 31: 525-31.
- 32 CONTAR, C. M. M.; SAROT, J.R.; BORDINI, J.J.; GALVÃO, G.H.; NICOLAU, G.V.; MACHADO, M.A.N. Maxillary ridge augmentation with fresh-frozen bone allografts. *J. Oral Maxillofac Surg* 67: (2009) 1280-1285.
- 33 BUTTERMANN, G. R. Prospective nonrandomized comparison of an allograft with bone morphogenetic proteins versus an iliac-crest autograft in anterior cervical discectomy and fusion. *The Spine Journal* 8 (2008) 426-35.
- 34 WOLL, J.E.; SMITH, D.M. Bone and Connective Tissue. *Clin Lab Med* 25 (2005) 499-518.
- 35 SHANNON, M.; RUSH, D.P.M. Bone Substitutes: Osteobiologics. *Clin.Podiatr. Med. Surg.*, 22 (2005) 619-630.
- 36 Screening and testing of donors of human tissues intended for transplantation. Washington, DC: FDA, Center for Biologics Evaluation and Research 1977.
- 37 KAGAN, R.J. Standards for tissue banking. McKlean (VA): American Association of Tissue Banks: 1998.
- 38 TOMFORD, W.W. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1995; 77: 1742-54.

-
- 39 PERROT, D.H.; SMITH, R. A.; KABAM, L.B. The use of fresh frozen allogeneic bone for maxillary and mandibular reconstruction. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, Lombard, v.21, p.260-265, 1992.
- 40 KHAN, SN.; CAMMISA, FP Jr.; SANDHY, HS et al. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 2005;13(1): 77-86.
- 41 SIMONIAN, P. T.; CONRAD, E.U., CHAPMAN, J.R. et al. Effect of sterilization and storage treatments on screw Strength in human allograft bone. 1994; 302: 290-6.
- 42 CENTERS FOR DISEASE CONTROL: Transmission of HIV through bone transplantation: Case report and public health recommendations. *MMWR* 39: 597-99,1998.
- 43 SIMMONDS, R.J., HOLMBERG, S. D., HURWITZ, R.L. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. *N. Engl. J. Med.* 326: 726-732, 1992.
- 44 GAZDAG, A.R.; LANE, J.M.; GLASER, D. et al. Alternative to autogenous bone graft: efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg* 1995;3:1-8. A REVIEW OF BONE S.
- 45 SIMPSON, D.; KAKARALA, G.; HAMPSON, K. et al. Viable cells survive in fresh frozen human bone allografts. *Acta Orthop.*78: 26, (2007).
- 46 STEVENSON, S.; HOROWITZ, M. The response to bone allografts. *J Bone Joint Surg* 1992;74-A: 939-50.
- 47 HEIPLE, K.G.; GOLDBERG, V.M.; POWELL, A.E. et al. Biology of cancellous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1987;18:179-85.

48 MALININ, T. Preparation and banking of bone and tendon allografts. In: Sherman OH, Minkoff J, editors. Arthroscopic surgery. Baltimore (MD): Williams & Wilkins; 1990. p. 65-86.

49 HESLOP, B.F.; ZEISS, I.M.; NISBET, M.W. Studies on the transference of bone: I. A comparison of autologous and homologous bone implants with reference to osteocyte survival, osteogenesis and host reaction. *Br J Exp Pathol* 1960; 41:269-87.

50 BURCHARDT, H. The biology of bone repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1983 Apr (174): 28-42.

51 PIKOS, M.A. Autografts for localized ridge augmentation: Part II. The posterior mandible. *Implant Dent.* 2000; 9 (1): 67-75.

52 CHAUSHU, G.; MARDINGER, O.; PELEG, M.; GHELFAN, O.; NISSAN, J. Analysis of complications following augmentation with cancellous block allografts. *J. Periodontol.* 2010 Dec; 81 (12): 1759-64.

53 BURCHARDT, H. Current concepts in bone grafting. In: Czitrom AA, Winkler H, editors. Orthopaedic allograft surgery. Wien: Springer; 1996. p. 3-10.

54 MA, T.; GUTNICK, J.; SALAZAR, B.; LARSEN, M.D.; SUENAGA, E.; ZILBER, S; HUANG, Z.; HUDDLESTON, J.; SMITH, R.L.; GOODMAN, S. Modulation of allograft incorporation by continuous infusion of growth factors over a prolonged duration in vivo. *Bone* 41 (2007): 386-392.

55 URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. *Science* 965;150:893-9.

56 HOWES, R.; BOWNESS, J.M.; GROTENDORST, G.R. et al. Platelet-derived growth factor enhances demineralized bone matrix-induced cartilage and bone formation. *Calcif Tissue Int* 1988;42: 34-8.

57 SANTOS, L.A.U. Efeito da utilização de plasma rico em plaquetas na osteointegração dos enxertos ósseos homólogos criopreservados: estudo histomorfométrico em coelhos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 140p.

58 MARX, R.E.; GARG, A.K. Dental and craniofacial applications of platelet-rich plasma. Chicago: Quintessence; 2005. 154p.

59 AHO, A.J.; ESKOLA, J., EKFOR, T. et al: immune responses and clinical outcome of massive human osteoarticular allografts. Clin Orthop Res 196, 1998.

60 MUSCLOW, C.E.; DIETZ, G.; BELL, R.S. et al. Alloimmunization by blood group antigens from bone allografts. Immunohematology 1992; 8:102-4.

61 GLOWACKI, J.; ALTOBELLI, D.; MULLIKEN, J.B. The fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects. Calcif Tissue Int 1981;33:71-6.

62 SU-GWAN, K.; HAK KYUN, K.; SUNG-CHUL, L. Combined implantation of particulate dentine, plaster of Paris, and a bone xenograft (Bio-Oss) for bone regeneration in rats. J Craniomaxillofac Surg 2001;29:282-8.

63 RODRIGUEZ, A.; ANASTASSOV, G.E.; LEE, H. et al. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. J Oral Maxillofac Surg 2003;61:157-63

64 SCARANO, A.; DEGIDI, M.; IEZZI, G. et al. Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. Implant Dent 2006;15(2): 197-207.

65 SAN JULIÁN, M.; VALENTÍ, A. Bone Transplant. An Sist Sanit Navar. 2006; 29 Suppl 2: 125-36.

66 SANTOS, L.A.U.; GIOVANI, A.M.M.; MARAGNI, G.G.; CROCI, A.T.; SHINZATO, J.C.O. Assistência de enfermagem nos transplantes de tecidos musculoesqueléticos: da captação ao uso clínico. In: Os caminhos da Enfermagem. Cap. 13, p. 215-246; Phorte, 2010.

67 AMATUZZI, M. M.; CROCI, A.T.; GIOVANI, A.M.M.; SANTOS, L.A.U. Banco de tecidos: estruturação e normatização. Rev Bras Ortop _ Vol. 35, Nº 5 – Maio, 2000.

68 NGUYEN, H.; MORGAN, D.A.; SLY, L.I.; BENKOVICH, M.; FORWOOD, M. R. Validation of 15 kGy as a radiation sterilization densidade de energia for bone allografts manufactured at the Queensland Bone Bank: application of VDmax 15 method. Cell Tissue Bank, 2008 Jun; 9 (2): 139-47.

69 BAKER, T.F.; RONHOLDT, C.J.; BOGDANSKY, S. Validating a low gamma radiation process for sterilizing allografts using ISO 11137 method 2B. Cell Tissue Bank. 2005; 6 (4): 271-5.

70 NGUYEN, H.; MORGAN, D.A .; FORWOOD, M.R. Sterilization of allograft bone: Effects of gamma irradiation on allograft biology and biomechanics. Cell Tissue Bank. 2007; 8(2) 93-105.

71 NGUYEN, H.; MORGAN, D.A.; FORWOOD, M.R. Sterilization of allograft bone: is 5 kGy the gold standart for gamma irradiation? Cells tissue bank. 2007; 8 (2): 81-91.

72 LOVE, D.; PRITCHARD, N.; BURGESS, T.; VAN DER MEER, G.; PAGE, R.; WILLIAMS, S. Audit of de Douglas Hocking Research Institute bone bank: ten years of non-irradiated bone graft. ANZ J. Surg. 2009 Jan-Feb; 79 (1-2): 55-61.

73 CAMALIER, C.E.; XIAO, Z.; NAGASHIMA, K.; CHAN, K.C.; LUCAS, D.A.; L CRUZ M.J. et al. Analisis of th extracellular matrix vesicle proteome in mineralizing osteoblasts. J.Cell.Phisiol. 2007 Feb; 210 (2): 325-35.

74 HOEXTER, D.L. Bone regeneration graft materials. J.Oral Implantol 2002; 28: 290-294.

75 ITOMAN, M.; NAKAMURA, S. Experimental study on allogenic bone grafts. Int.Orthop. 1991; 15: 161-165.

76 SHAND, J.M.; HEGGIE, A.A.; HOLMES, A.D.; HOLMES, W. Allogeneic bone grafting of calvarial defects: an experimental study in the rabbit. Int. J. Oral Maxillofac.Surg. 2002; 31: 525-531.

77 BRÅNEMARK, P-I; BREINE, U.; HANSSON, B.O.; LINDSTRON, J.; OLSSON, A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg, 3:81, 1969.

78 ALBREKTSSON, T. Repair bone of grafts Scand J Plast Surg, 14:1-12, 1980.

79 WEINSTEIN, S. L.; BUCKWALTER, J. A. Ortopedia de Turek principios e sua aplicação. 4ª ed. São Paulo: Manole; 1991.

80 CRUZ, D.R.; KOHARA, E.K.; RIBEIRO, M.S.; WETTER, N.U. Effects of lowintensity *laser* therapy on the orthodontic movement velocity of human teeth: a preliminary study Lasers. Surg Med 2004; 35: 117-20.

81 REDDY, G.K. Comparison of the photostimulatoryeffectos of visible He-Ne and infrared Ga-As *lasers* on healing impaired diabetic rat wounds. Lasers Surg. Med. New York, vol. 33, n. 5, p. 344-351, 2003.

82 LUNGER, E.J.; ROCHKIND, S.; WOLLMAN, Y.; KOGAN, G. Effect of Low-Power Laser Irradiation on the Mechanical Properties of Bone Fracture Heling in Rats. Lasers Surg. Med. V.22, n.2, p.97-102, 1998.

83 JAKSEN, N.; PAYER, M.; TANGI, S.; BERGHOLD, A.; 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.* Aug; 18(4): 517-24, 2007.

84 GARAVELO-FREITAS, I. Ação do *laser* HeNe na osteogênese. 2001, 83p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

85 GARAVELO-FREITAS, I. et al. Low-Power *laser* irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during **tibia** wound healing in rats. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 70, p. 81-89, 2003.

86 JUNIOR, A.S.; PINHEIRO, A.L.; RAMALHO, L.; NICOLAU, R. Computerized Morphometric Assessment of the effect of Low-level *laser* therapy on bone repair: an experimental animal study. *J. Clin. Laser Surg* 2002; 20:83-87.

87 GAO, X.; XING, D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power *laser* irradiation. *J Biomed Sci* 2009; 16:4.

88 ZHAO, Z.Q.; FAIRCHILD, P.W. Dependence of light transmission through human skin on incident beam diameter at different wavelengths. In: Steven L. Jacques, ed. *SPIE Proceedings of Laser-Tissue Interaction IX*. Bellingham, WA: SPIE, 1999:354-360.

89 SKOPIN, M.D.; MOLITOR, S.C. Effects of near-infrared *laser* exposure in a cellular model of wound healing. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2009; 25:75-80.

90 PINHEIRO, A. L.; GERBI, M. E. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg. Larchmont*, v. 24, n. 2, p. 169-178. 2006.

91 MESTER, E.; SPIRY, T.; TOTA, J.G. Effect of *laser* rays on wound healing. *Am.J. Surg.* 1971; 122: 532-5.

92 NAGASAWA, A.; KATO, K.; NEGISHI, A. Bone regeneration effect of low *lasers* including argon *laser*. *Laser Therapy* 1991; 2: 175-8.

94 GIORDANO, I.G.V.; KNACKFUSS, R.C.G.; GIORDANO, M.,; MENDONÇA, R.G.; COUTHYNHO, F. Influência do *laser* de baixa energia no processo de consolidação de fratura de tíbia: estudo experimental em ratos. *Rev Bras Ortop* 2001, 36: 174-178.

95 JAKSEN, N.; PAYER, M.; TANGL, S.; BERGHOLD, A.; 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.* Aug; 18(4): 517-24, 2007.

96 AITO, S.; SHIMIZU, N. Estimulatory effects of low-power *laser* irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *J. Orthod. Dentofac. Orthop.* V. 111, n. 5, p. 32-525, 1997.

97 YAMAMOTO, M.; TAMURA, K.; HIRATSUKA, K.; ABIKO, Y. Stimulation of MCM3 gene expression in osteoblast by low level *laser* irradiation. *Lasers Med Sci.*2001; 16: 213-217.

98 ABIKOA, Y.; HIRATSUKA, K.; HAMAJIMAA, S.; OHTAB, M.; IDEB, K.; SASAHAR, H. Genome science-based gene expression monitoring in osteoblasts altered by low-level *laser* irradiation, *International Congress Series* 1248 (2003) 433–436

99 Y. OZAWA, N.; SHIMIZU, G.; KARIYA, and Y. ABIKO. Low-Energy Laser Irradiation Stimulates Bone Nodule Formation at Early Stages of Cell Culture in Rat Calvarial Cells. *Bone* Vol. 22, No. 4 April 1998:347-354.

100 KARU, T. Photobiology of low-power *laser* effects. *Health Phys*, 56:691-704,1989.

101 RIBEIRO, M. S. Interação da radiação *laser* linearmente polarizada de baixa intensidade com tecidos vivos: Efeitos na aceleração de cicatrização tissular em lesões de pele. Tese (Doutorado), IPEN/USP, 2000.

102 MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENDE, B.; TOTA, J.G. Effect of *laser* rays on wound healing. Am J Surg, 122:532-535, 1971.

103 PINHEIRO, A.L. et al. Effect of infrared *laser* light further improves bone healing when associated with inorganic bovine bone. Braz Dent J., Ribeirão Preto, v. 14, n. 3, p. 177-181, 2003.