

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

MARCELO VINÍCIUS ANDRADE LIMA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA INFLUÊNCIA DO USO DO LASER DE BAIXA
POTÊNCIA NA ACELERAÇÃO REPARAÇÃO DE FERIDAS DE TECIDO MOLE EM
RATOS.**

**SÃO PAULO
2005**

MARCELO VINÍCIUS ANDRADE LIMA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA INFLUÊNCIA DO USO DO LASER DE BAIXA
POTÊNCIA NA ACELERAÇÃO DA REPARAÇÃO DE FERIDAS DE TECIDO MOLE
EM RATOS.**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CURSO DE
PÓS-GRADUAÇÃO, NÍVEL MESTRADO, DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
ODONTOLOGIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
IMPLANTODONTIA.

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO JOSÉ
BORDINI

SÃO PAULO
2005

Cutter
Patri nº 3845
Tipo entrada DOAÇÃO
Nota Fiscal
Data rec. 23.1.10.108
Preço
Origem NUSP S.A.
Implantodontia S.P.

Lima, Marcelo Vinícius Andrade

Avaliação da influência do uso do laser de Baixa Potência na reparação de feridas de tecido mole em ratos./ Marcelo Vinícius Andrade Lima. Orientação do Prof. Dr. Paulo José Bordini.
São Paulo; 2005

Dissertação (Mestrado). Área de concentração em Implantodontia. Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro.

1. Tecido Mole 2. Laser de baixa potência 3. Reparação de tecido conjuntivo
I. Título

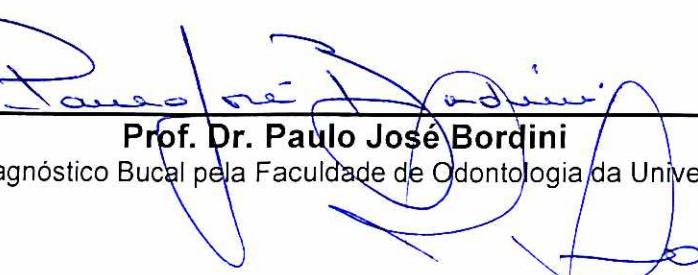
**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA INFLUÊNCIA DO USO DO LASER DE
BAIXA POTÊNCIA NA ACELERAÇÃO DA REPARAÇÃO DE FERIDAS DE
TECIDO MOLE EM RATOS**

Marcelo Vinícius Andrade Lima

Dissertação apresentada á
Universidade de Santo Amaro para a
obtenção do título de mestre, pelo
programa de pós-graduação em
odontologia. Área de concentração
Implantodontia, sob orientação do
Prof. Dr. Paulo José Bordini

Aprovada em ___/___/___

Banca Examinadora



Prof. Dr. Paulo José Bordini

Doutor em Diagnóstico Bucal pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Fátima Neves Faraco

Doutora em Clínica Integrada pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo



Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes

Doutora em Imunologia pelo ICB USP

Dedicatórias

Ao meu pai "*in memoriam*" e minha mãe, Urbano e Leila, minhas referências e meus exemplos de vida. Vocês são únicos.

À minha esposa Martha pelo amor, carinho e respeito que sempre tem comigo e por me incentivar em todos meus objetivos.

Ao meu filho Henrique que está me ensinando a ser pai. Eu te amo.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Nelson Villa, por seu conhecimento e altruísmo. Sem sua participação esta tese não sairia do papel.

A Profa. Dra. Manuela Martins, pela ajuda incondicional nas fotos desta tese, se dispondo a ceder um tempo de suas merecidas férias para me ajudar.

A técnica do Laboratório de Histologia Kay pela confecção das lâminas usadas no estudo.

A todos os colegas da IV turma de mestrado em implantodontia, todos sem exceção, com especial menção aos amigos Prof. Paulo Kawakami, Dr. Luiz Mangueira Macedo, Dr. Sergio Henrique de Oliveira e Prof. Pedro Feitosa, pelo coleguismo nesta jornada.

Ao Amigo Prof. Alberto Blay, pelo empréstimo do aparelho de laser utilizado nesta tese.

Ao Professor Milton Satoiqui Masuda por acreditar em meu trabalho e permitir meu ingresso à carreira docente.

RESUMO

Os lasers terapêuticos ou lasers de baixa potência são, talvez, os mais estudados mundialmente, e com certeza já fazem parte da rotina de uma grande quantidade de consultórios. Alguns dos lasers utilizados na Odontologia estão situados na faixa de luz visível(Argônio e alguns lasers terapêuticos) e outros na faixa do infravermelho, portanto, invisíveis a olho nu.O propósito deste estudo foi avaliar se o uso do laser de baixa potência influencia a reparação de tecido mole, em ratos da raça Wistar. Em caso positivo, como a aplicação do laser modificaria a resposta reparativa. Foram utilizados 32 ratos, fêmeas, adultas (4 meses e meio), com \pm 250g cada, com controle de linhagem e origem segundo padrões de experimentação. Os ratos foram divididos em 2 grupos, de 16 ratos cada um. Depois os ratos foram tricotomizados em seus dorsos e então sedados com éter. No grupo experimental foi realizado um corte do tecido mole com um bisturi circular de 5mm de diâmetro , por 3mm de profundidade e o tecido remanescente removido com o auxílio de uma pinça dente de rato. Isto feito, o laser de baixa potência, MINILASER 2075 F dent, foi aplicado com uma dosagem de 16J/cm². No outro grupo, denominado controle, o laser não foi aplicado. A antibioticoterapia não foi utilizada em nenhum dos dois grupos. A análise histológica de cada grupo foi realizada aos 3, 5, 7 e 10 dias após a cirurgia. Os ratos foram mantidos em gaiolas separadas até o final do estudo. Os cortes histológicos sob a coloração de HE foram avaliados com um aumento de 10X, 20x e 40X. A análise histológica mostrou que o uso do laser a reparação tecidual mostrou tendência a ser mais rápida. Portanto, o laser pareceu

influenciar positivamente o processo reparativo de tecido mole em ratos, com uma dosimetria de $16\text{J}/\text{cm}^2$.

Palavras chaves: tecido mole, laser de baixa potência, reparação de tecido conjuntivo.

ABSTRACT

Therapeutic lasers or lasers of low power are maybe the laser most studied globally, and with certainly they are already part of the routine of a great amount of clinics. Some lasers used in Dentistry are placed in the bandwidth of infrared, therefore, invisible with bare eye. The purpose of this study was to evaluate if the use of low power laser influences in soft tissue's repairing, in rats. If right, how the laser's use changes the reparative answer. In this research 32 Wistar rats were used, males, adults (\pm five months⁰, with \pm 250g each, coming from UNITOX of UNISA, with lineage and origin control according to experiment patterns. The rats were divided in two groups, of 16 rats each. Then the rats were trichotomyed in their backs and sedated with ether. In the experimental group a 3mm depth cut in the soft tissue was accomplished with a 5 mm diameter circular bistoury and the remaining tissue removed with the aid of tweezers and a bistoury sheet. This done, the low power laser, MINILASER 2075 F dent, was applied with a dosage of $16j/cm^2$. In the other group, denominated control, the laser was not applied. The therapy with antibiotic was not used in any of the groups. The material was picked in four rats of each group, with three, five, seven and ten days from surgery. The rats was kept in separate cages until the study have ended. The histological cuts under the HE coloration were appraised with an increase of 100X and 400X, showing that with the laser's use the repairing process showed tendency to be faster, therefore, the laser seemed to influence positively the reparative process showed tendency to be faster, therefore, the laser seemed to influence positively the reparative process of the soft tissue in rats, and that with a

dosimetry of $16\text{j}/\text{cm}^2$ could observe as the differences were not significant in level of observation of optical microscopy.

Key Words: soft tissue, low level laser therapy.

LISTA DE FIGURAS

	Pag
FIGURA 1- Apresentação de uma gaiola onde os ratos foram mantidos.	38
FIGURA 2- Ratos já submetidos ao punch de 5mm de diâmetro.....	39
FIGURA 3- Bisturi circular "punch" NOBELBIOCARE®.	39
FIGURA 4- Aspecto da realização da incisão para remoção do tecido do dorso do rato.	40
FIGURA 5- Área incisada após a utilização do bisturi circular.	40
FIGURA 6- Aspecto de um animal sedado já submetido a incisão.....	41
FIGURA 7- Aparelho de Laser utilizado MINILASER 2075 F dent e Óculos de proteção	41
FIGURA 8- Aplicação do laser na ferida cirúrgica do dorso de um dos espécimes.....	42
FIGURA 9- Aplicação em outro espécime mostrando a distância de 0,5 cm.	42
FIGURA 10- Tecido Biopsiado de um dos animais.	43
FIGURA 11- Infiltrado Linfoplasmocitário- Aumento 20x. HE.....	45
FIGURA 12- Fibras com melhor orientação do que o grupo controle- Aumento 20x. HE	46
FIGURA 13- Fibroblastos, Plasmócitos, Polimorfonucleares e vasos congestos-Aumento40x.HE	47
FIGURA 14- Epitélio formado em todas as camadas- Aumento20x.HE	48

FIGURA 15- Grupo controle dez dias- Aumento 4 x. HE.....	51
FIGURA 16- Grupo experimental dez dias- Aumento 10x.HE.....	51
FIGURA 17- Grupo experimental dez dias- Aumento 20x.HE.....	52
FIGURA 18- Grupo experimental dez dias- Aumento 20 x. HE.....	52
FIGURA 19- Grupo experimental dez dias- Aumento 20 x. HE.....	53
FIGURA 20- Grupo controle dez dias- Aumento 40x. HE.....	53
FIGURA 21- Grupo experimental 10 dias- Aumento 10x-HE.....	54
FIGURA 22- Grupo experimental 10 dias- Aumento 10x-HE.....	55
FIGURA 23- Grupo experimental 10 dias- Aumento 20x- HE.....	55
FIGURA 24- Grupo experimental - Aumento 40x-HE.....	56

LISTAS DE SIGLAS

ATP	-	Adenosina trifosfato
CO ₂	-	Dióxido de Carbono
CO ₂ /Nd:YAG	-	Dióxido de Carbono/Neodímio: granada de ítrio e alumínio
Er:YAG	-	Érbio: granada de ítrio e alumínio
GaAlAs	-	Arseneto de Gálio e alumínio
GaAs	-	Arseneto de Gálio
HE	-	Hematoxilina eosina
HeNe	-	Hélio e Neônio
Hz	-	Hertz
InGaAlP	-	Arseneto de Gálio, Índio e fósforo
J/cm ²	-	Joule por centímetro quadrado
LILT	-	Terapia de laser de baixa intensidade
mm	-	Milímetro
mW	-	Miliwatt
N ₂	-	Gás Nitrogênio
Nd:YAG	-	Neodímio: granada de ítrio e alumínio
nm	-	Nanômetro

P	-	Potência
PMN	-	Polimorfonucleares
UNISA	-	Universidade Santo Amaro
UNITOX Amaro	-	Unidade de toxicologia da Universidade Santo Amaro
W	-	Watt
YSGG	-	Granada de ítrio, escândio e gálio
λ	-	Comprimento de onda
COX 1	-	Ciclooxigenase 1
COX 2	-	Ciclooxigenase 2

Lista de Tabelas

Pag.

Tabela 1- Período de realização das biópsias pós- cirurgia segundo os grupos.....	38
--	-----------

Sumário

p.

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTAS	
1 INTRODUÇÃO	17
2 PROPOSIÇÃO	22
3 REVISÃO DA LITERATURA	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
5 RESULTADOS	44
5.1 BIÓPSIAS AOS 3 DIAS	44
5.1.1 GRUPO CONTROLE	44
5.1.2 GRUPO EXPERIMENTAL	45
5.2 BIÓPSIA AOS 5 DIAS	46
5.2.1 GRUPO CONTROLE	46
5.2.2 GRUPO EXPERIMENTAL	47
5.3 BIÓPSIAS AOS 7 DIAS	49
5.3.1 GRUPO CONTROLE	49
5.3.2 GRUPO EXPERIMENTAL	49
5.4 BIÓPSIA AOS 10 DIAS	50
5.4.1 GRUPO CONTROLE	50
5.4.2 GRUPO EXPERIMENTAL	54
6 DISCUSSÃO	57

7 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXO I	

1. INTRODUÇÃO

Existe uma preocupação para os profissionais de Implantodontia e cirurgia oral que realizam procedimentos cirúrgicos envolvendo grandes e pequenas áreas: O pós-operatório; no que tange a redução de dor pós-operatória, redução de edema, controle da inflamação e, de maneira geral, uma melhoria quantitativa e qualitativa na reparação tecidual. Uma ferida cirúrgica bem fechada e que cicatrize rapidamente é o objetivo primordial de qualquer cirurgião. O uso de medicamentos antiinflamatórios é uma das formas de controlar de maneira eficaz a cascata de reações inflamatórias provenientes de um ato cirúrgico, no entanto muitos efeitos adversos, tais como irritações de mucosas gástricas, hemorragias gástricas, úlceras gástricas podem acontecer em alguns pacientes após o uso de antiinflamatórios não esteroidais principalmente nos inibidores da COX 1, e nos antiinflamatórios inibidores da COX 2, os quais são creditados por seus fabricantes efeitos adversos reduzidos, entretanto os efeitos benéficos e deletérios ainda são obscuros para a comunidade científica, necessitando de estudos de longevidade para comprovação de sua eficácia.

Em virtude destas evidências, seria interessante o uso de algum artifício que aprimorasse de alguma forma a cicatrização tecidual nas cirurgias orais, incluindo a colocação de implantes.

Ao encontro deste anseio, existe hoje no mercado um grande número de aparelhos emissores de laser que prometem justamente a aceleração da cicatrização tecidual, redução de edema e dor pós-operatória.

Blay em 2001, relatou que em 1917, Albert Einstein determinou em sua teoria da relatividade, que a emissão de luz por um átomo pode ser estimulada pela própria radiação incidente, sendo possível assim a obtenção de uma forma de amplificação da luz, denominada laser.

O nome “laser” expressa exatamente como a luz laser é produzida. Esta palavra é constituída pelas primeiras letras da expressão “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”, que significa “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação”. O emissor laser é um dispositivo composto por substâncias (gás, pedras preciosas), que geram luz quando excitadas por uma fonte de energia. Alguns dos aparelhos de laser utilizados na Odontologia estão situados na faixa da luz visível (Argônio e alguns aparelhos de laser terapêuticos) e outros na faixa do infravermelho, portanto, invisíveis a olho nu (ALMEIDA-LOPEZ; BRUGNERA, 1998).

O aparelho de laser terapêutico ou aparelho de laser de baixa potência são talvez os mais estudados mundialmente, e com certeza já fazem parte da rotina de uma grande quantidade de consultórios em países como Espanha, Estados Unidos e Japão. As razões da popularidade deste tipo de laser estão relacionadas ao baixo custo do equipamento, e à objetividade e simplicidade dos procedimentos clínicos terapêuticos a que se destina.

Os primeiros aparelhos de laser terapêuticos estudados foram os que apresentaram como meio ativo uma mistura gasosa de Hélio e Neônio (HeNe), com potência variando entre 5 e 30mW e comprimento de onda de 632,8 nm, o que está situado dentro da faixa de luz visível do espectro de luz, mais precisamente na região da cor vermelha.

Estes aparelhos consistiam de um reservatório (tubo) de vidro preenchido com os referidos gases, e acionados por uma fonte de alimentação elétrica geradora da alta tensão. A condução da luz até o ponto de aplicação se dava através de cabo de fibra óptica flexível, o que conferia um baixo rendimento óptico ao sistema, isto é, pouca luz chegava ao ponto de aplicação.

Aliado à característica de baixo rendimento óptico, há ainda o fato de que este comprimento de onda é altamente absorvido pelo tecido mole, comprometendo muito a penetrabilidade da luz.

Estas limitações técnicas impuseram a necessidade de se buscar aparelhos de laser de baixo custo, com níveis de potência superiores e com comprimentos de onda que pudessem atravessar o tecido mole, sem, contudo, comprometer a integridade destes tecidos. Isso foi possível com o surgimento dos aparelhos de laser diodo, que são dispositivos eletrônicos relativamente simples e de baixo custo.

Os aparelhos de laser diodo mais utilizados na Odontologia, têm como meio ativo o composto de GaAlAs, com comprimento de onda variando entre 790 e 850 nm (o mais utilizado é o de 830 nm), que está situado fora da faixa visível do espectro de luz, mais precisamente na faixa do infravermelho, com potência variando entre 20 e 100 mW.

Outro tipo de meio ativo utilizado é o composto de InGaAlP, que produz luz com comprimento de onda variando entre 635 e 690 nm, que está situado dentro da faixa de luz visível do espectro de luz, mais precisamente na região da cor vermelha, com potência variando entre 1 e 50mW. A luz gerada por este tipo de emissor, tem as mesmas características descritas para o emissor de gás HeNe, e, portanto, as mesmas limitações em termos de penetrabilidade.

Uma das variáveis mais relevantes para o processo da laserterapia é a dosimetria ou fluência, que nada mais é do que a quantidade de energia (expressa em Joules), aplicada sobre uma determinada área (expressa em centímetros quadrados). Apesar destes parâmetros servirem como base de referência, caberá ao clínico definir a dosimetria para cada paciente levando-se em consideração o tipo de lesão, sua profundidade, seu tempo de duração (crônica ou aguda), o tipo de tecido, a idade do paciente e sua condição sistêmica, entre outros itens analisados na anamnese (ALMEIDA-LOPEZ; BRUGNERA, 1998).

As indicações gerais do laser terapêutico, já que este estimula a microcirculação, bem como o trofismo celular local, podem ser: alívio da dor (efeito antiálgico), reparação tecidual (efeito bioestimulador do trofismo celular) e redução de edema e de hiperemia (efeito antiinflamatório, antiedematoso e normalizador circulatório) (ALMEIDA-LOPEZ;BRUGNERA,1998).

Os aparelhos de laser de baixa intensidade têm sido amplamente utilizados em Odontologia e Medicina. Os mecanismos envolvidos nos efeitos observados com este tipo de laser preconizam a *Low Intensity Laser Therapy (LILT)*- terapia com lasers de baixa intensidade, no entanto, esta terapia não é recente, já que na Rússia existem relatos que indicam, pelo menos, trinta anos de experiência, seguidos pelo Japão e Europa (BLAY,2001).

Os aparelhos de laser mais usados na Odontologia são os que apresentam meio ativo o Hélio-Neônio, o Argônio e o Arseneto de Gálio-Alumínio(BLAY,2001).

As lesões dos tecidos moles podem ser causadas por agressões físicas ou químicas e o epitélio lesado tem uma capacidade regenerativa que permite restabelecer a integridade tecidual através de migração celular. A reparação tecidual se dá por estágios: estágio inflamatório - inicia-se no momento que a lesão ocorre e

dura de 3 a 5 dias e possui os sinais cardinais da inflamação (rubor, edema, calor e dor); estágio fibroblástico – caracterizada pela formação da rede de fibrina, dura normalmente 2 a 3 semanas; e estágio de remodelação – quando ocorre a contração da ferida, sendo restaurado o epitélio após 3 semanas (Peterson et al.,1996).

Considerando que a laserterapia é uma opção que pode ser oferecida na clínica, procurou-se avaliar com este estudo a influência da aplicação do laser de baixa intensidade na reparação de feridas de tecido mole.

2. Proposição

O propósito deste estudo é avaliar histologicamente a influência do laser de luz visível e potência de 75 mw, comprimento de onda de 680 nm e fluência de $16\text{J}/\text{cm}^2$ em sessão única na aceleração da reparação de tecido mole, em ratos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Mester et al.(1971), realizaram um dos primeiros trabalhos em reparação de queimaduras. Nesse trabalho, foi investigado o efeito de um laser de Rubi ($\lambda=694,3$ nm), com intervalos de doses de $0,5 \text{ J/cm}^2$ a 10 J/cm^2 . Os resultados obtidos mostraram que a exposição à radiação laser estimulou a reparação de queimaduras de terceiro grau, mais pronunciadamente na dose de 1 J/cm^2 , com 3 irradiações nos dias 3,7 e 12 do pós operatório. Os autores sugeriram que a reparação de feridas, estimulada pela radiação laser, envolveu um aumento na taxa de crescimento epitelial, o que pode, eventualmente, ser o ponto de partida para o crescimento neoplásico.

Herrero, em 1986, afirmou ser mais confiável, em termos de dosimetria, fazer o uso de aplicações pontuais, do que pela técnica de varredura. Acrescentou também que há variações na dosimetria a ser aplicada, de acordo com cada situação ou área e que não é aconselhável ultrapassar a densidade de 15 J/cm^2 sobre um ponto, em uma aplicação.

Foi publicada, em 1986, uma experiência em ratos mutantes, com aplasia de timo, causando uma ferida cirúrgica no dorso dos animais, por Mayayo e Trelles. Foi aplicado laser de HeNe com fluência de 2 a 4 J/cm^2 e resultou que todos os ratos que não receberam o laser desenvolveram septicemia, enquanto que os outros ratos sobreviveram. Os autores chegaram a conclusão que o laser estimula a presença de células fagocitárias e que aumentam a resistência local.

Chomette et al., em 1987, publicaram o efeito do laser de baixa intensidade na gengiva biopsiada de 14 pacientes, sendo que após as biópsias iniciais, foram realizadas novas biópsias na gengiva dos mesmos pacientes em locais não

irradiados. Os autores concluíram que na ausência de inflamação, a reparação foi similar nos tecidos irradiados e no grupo controle no sentido de organização da reparação, mas também observaram que a aplicação de laser induziu uma reparação precoce, em 14 dias no grupo irradiado, enquanto no grupo controle foi em 21 dias.

O efeito da cirurgia a laser nos tecidos periodontais foi estudado histologicamente em cães, em 1988, por Goultschin et al., e não demonstrou nenhuma vantagem substancial na gengivectomia com laser sobre a convencional.

Trelles et al. (1988), utilizaram um laser de emissão vermelha, emitido em $\lambda=632,8$ nm, variando potências de 4 mW ou 50 mW, com fluência de $2,4$ J/cm², para irradiar ratos. Eles chegaram a conclusão de que para $P=4$ mW, o aumento de histamina foi de 100%, enquanto que, com potência de 50mW, o aumento foi de 30%. Isto mostrou que existe uma potência ideal para se criar os efeitos desejados em um tecido irradiado pelo laser. Os efeitos antiinflamatório e antiedematoso dependem ainda da aceleração de neoformação capilar, originando alterações na pressão hidrostática dos capilares e reabsorção do edema, bem com a eliminação de metabólitos intermediários, como o ácido pirúvico e lático.

Os mesmos autores, em 1989, mostraram que o laser acelera a reprodução de células epiteliais e sua maturação, por meio do aumento da atividade da fosfatase ácida, estearase, desidrogenase láctica e succinildesidrogenase. Essas conclusões demonstraram que as células filhas apresentaram características morfológicas e funcionais idênticas às antecessoras, sem apresentar sinais de atipia.

Karu (1989) publicou um artigo no qual foi feita uma revisão da fotofobia associada aos efeitos do laser de baixa intensidade. Após vários estudos

quantitativos, para determinar a ação da luz monocromática visível de baixa intensidade sobre várias células, bem como para determinar as condições ideais de irradiação (comprimento de onda, dose e intensidade) que conduzem à estimulação da atividade vital, ela concluiu que o processo de bioestimulação a laser é um fenômeno fotobiológico. A radiação a laser é desencadeadora para a regulação do metabolismo celular, por esse motivo é que são necessárias apenas baixas doses de energia. O efeito sobre a célula vai depender do estado fisiológico que esta se encontra.

O laser de dióxido de carbono foi avaliado por Pogrel, em 1989, em 27 pacientes que necessitavam de cirurgia pré-protética, incluindo frenectomia, redução de tuberosidade, remoção de hiperplasia e aprofundamento de sulco. A contração cicatricial no grupo do laser ocorreu menos do que no grupo controle não irradiado. O laser de dióxido de carbono pareceu ter vantagens nas cirurgias pré-protéticas.

Rigau et al., em 1991, estudaram as mudanças metabólicas, a proliferação e a viabilidade de fibroblastos da pele de um humano sadio, depois da irradiação *in vitro* com um aparelho de laser de HeNe, operando em regime contínuo, de 10mW de potência. A análise estatística dos dados mostrou que não houve aumento no número de fibroblastos após a exposição, mas revelou mudanças significantes nas taxas metabólicas, quando comparadas ao controle. Nesse estudo, os autores não especificaram a densidade de energia utilizada, mas declararam que o resultado da avaliação dessas mudanças metabólicas sugere que uma modalidade eficiente para o aumento ou modulação da atividade celular poderia ser determinada e, portanto, ser utilizada para propósitos terapêuticos, desde que as densidades de energia e potência apropriadas fossem estabelecidas.

White; Goodie e Rose, em 1991, compararam, em cirurgia odontológica de tecido mole, a influência do uso de laser de Neodímio: ítrio-alumínio-granada e a cirurgia convencional. A técnica cirúrgica foi avaliada quanto à profundidade da bolsa periodontal, grau de dor, sangramento, inflamação e tempo do procedimento; e as análises foram feitas uma semana e hum mês após a cirurgia. Nenhuma diferença foi observada entre a cirurgia com o uso do laser e a convencional quanto à redução da profundidade da bolsa, dor pós-operatória, inflamação pós-operatória e tempo de tratamento, no entanto, o sangramento trans e pós-operatório foi significativamente menor quando se aplicou a radiação laser.

O estudo de Arcoria et al. (1992), avaliou o laser de CO₂/Nd:YAG usado durante cirurgia periodontal em cachorros, com o propósito de remover porções ósseas das superfícies radiculares para aumentar a reinserção de tecido mole. Os defeitos periodontais foram produzidos com artefatos ortodônticos. A hemi-arcada inferior esquerda foi irradiada com laser a 424,63 J/cm², a hemi-arcada superior esquerda foi irradiada com 849,3 J/cm². A hemi-arcada inferior direita foi tratada com cirurgia convencional e a hemi-arcada superior direita serviu como controle. Catorze dias após o tratamento, a gengiva inserida foi sondada para avaliar a aderência de tecido mole ao osso. Como resultado, os autores, relataram que a irradiação a laser de baixa intensidade não melhorou a inserção de tecido mole quando comparado com o tratamento convencional e a irradiação a laser de alta intensidade produziu significativamente menos inserção e aumentou a necrose tecidual.

Lubart et al.(1992), com a finalidade de examinar o efeito de vários comprimentos de onda em diferentes doses de energia, decidiram irradiar fibroblastos, com fonte de luz em 360 nm, 632 nm e 780 nm, tendo sido verificado

que em uma determinada dose de energia ($D= 15 \text{ J/cm}^2$ para $\lambda=632 \text{ nm}$, $D=7 \text{ J/cm}^2$ para $\lambda=780 \text{ nm}$ e $D= 0,6 \text{ J/cm}^2$ para $\lambda= 360 \text{ nm}$) ocorre a aceleração da mitose celular. O maior grau de mitose celular foi alcançado com o grupo irradiado com o laser de HeNe, aplicado com uma densidade de energia de 15 J/cm^2 . Em doses de energia mais altas as células foram destruídas.

Os efeitos da irradiação com três tipos de laser de baixa intensidade foram estudados por Nara et al. (1992), um de HeNe ($\lambda=632,8 \text{ nm}$ e $P= 5 \text{ mW}$) e dois de semicondutor ($\lambda=790 \text{ nm}$ e 830 nm , $P= 34 \text{ mW}$ e 14 mW , respectivamente) na proliferação de fibroblastos humanos, tendo sido os resultados comparados *in vitro*. Os fibroblastos da polpa dentária humana foram obtidos de subculturas, sendo estas, incubadas por 48 horas antes da irradiação a laser. Cada tipo de radiação laser foi usada no modo de emissão contínua e a irradiação foi realizada quatro vezes. Depois da incubação, as células foram fixadas e coradas em lâminas e o número de núcleos foi contado. O laser de HeNe mostrou a capacidade de acelerar a proliferação de fibroblastos da polpa em uma baixa dose de irradiação. Por outro lado, os aparelhos de laser de semicondutor falharam na produção de qualquer efeito estimulativo sobre estes fibroblastos.

Lee e Kim, em 1993, investigaram a influência da terapia com laser de baixa intensidade no processo de reparação de feridas da pele infectadas por bactérias com um aparelho de laser de gAaS ($\lambda= 904 \text{ NM}$), já que os estudos realizados até esta época foram em tecidos moles normais. O laser foi utilizado no modo de emissão pulsado, com pico de potência de 27 W . A frequência do pulso foi 1000Hz resultando numa potência média de 2 mW , sendo a densidade de energia utilizada de $76,4 \text{ J/cm}^2$; a área total irradiada correspondeu a um círculo de 2 cm de diâmetro. As feridas abertas, de aproximadamente 6 mm de diâmetro, foram criadas

nas regiões glúteas de sete ratos. Colônias de *Staphylococcus aureus* foram semeadas em todas as feridas. Uma ferida em cada rato foi irradiada com laser nos dias 1,2,3 e 4 e a ferida não irradiada foi deixada para controle. As áreas dos ferimentos foram medidas, fotografando a lesão de uma distância constante, usando a mesma lente objetiva, no 1º, 3º, 5º, 7º dia pós-operatório e, então os grupos controle e experimental foram comparados de acordo com o intervalo de tempo. Os resultados mostraram que a incidência de edema foi menor, e que a taxa de reparação da ferida foi significativamente aumentada no grupo experimental, devido a um efeito positivo sobre a microcirculação local. Os autores sugeriram que a aceleração da reparação da lesão infeccionada, após a irradiação com laser, indicou que a atividade celular, devido ao efeito bioestimulante da terapia com laser de baixa intensidade, predomina no tecido normal circunvizinho.

Leukauf et al., em 1993, estudaram as características da ablação de tecido de dois lasers infravermelho com comprimentos de onda diferentes, de $\lambda=2120$ nm e $\lambda=308$ nm, num modelo animal. As incisões com o laser foram realizadas na região sublingual e na gengiva de ratos brancos. Como resultados tiveram que ambos os lasers permitiram um excelente controle da ablação do tecido, e a reparação da ferida analisada dez dias após as incisões mostrou o fechamento completo pela reepitelização.

Uma variedade de sistemas de lasers está sob investigação como potenciais ferramentas na Odontologia, segundo Eversole e Rizoju (1995). A maioria destes sistemas tem mostrado serem eficazes para cirurgia de tecido mole de membranas mucosas, no entanto, cortar osso e tecidos dentais só tem sido possível recentemente. Neste artigo da Universidade da Califórnia na Escola de Odontologia de Los Angeles, uma revisão das aplicações do laser na Odontologia foi discutida. A

utilidade de um novo sistema de laser usando um meio de érbio YSGG com spray de água para cortar tecidos moles, osso, esmalte e dentina está sob investigação e os achados preliminares da pesquisa foram apresentados, tendo como resultado mínima hemorragia.

Eduardo, Cecchini e Cecchini, em 1996, apresentaram cinco estudos clínicos sobre benefícios do laser de baixa intensidade na reparação de tecido mole oral. Lesões na cavidade oral, como herpes e úlceras aftosas, foram irradiadas com laser de GaAlAs ($\lambda=790$ nm), em doses que dependem da área de irradiação. A terapia com laser de baixa intensidade diminuiu a sintomatologia dolorosa imediatamente e acelerou o processo de reparação destas lesões. Também uma associação de lasers de Nd:YAG ($\lambda= 1064$ nm) e GaAlAs provou ser eficaz nesse tipo de lesão. Os autores sugeriram que essa associação e lasers de alta e baixa intensidade pode ser um complemento para terapias convencionais.

Watanabe et al., em 1996, avaliaram a utilidade clínica do laser de érbio:YAG em cirurgia de tecido mole e raspagem periodontal. Trinta e um pacientes com feridas de tecido mole e 60 pacientes com cálculos gengivais foram tratados com o laser. A cirurgia com o uso do laser causou menos hemorragia e resultou numa melhor reparação quando comparado com os métodos convencionais e foi mais fácil remover o cálculo dentário em 95% dos casos, portanto, este estudo sugeriu que o laser de Er:YAG é útil para cirurgia de tecido mole e raspagem periodontal.

Centty et al., em 1997, estudaram comparativamente a cirurgia periodontal convencional combinada com o laser de dióxido de carbono e somente a cirurgia periodontal convencional, com respeito a eliminação de epitélio e ao grau de necrose dos retalhos mucoperiostais. O laser pareceu ser mais efetivo na remoção

do epitélio no momento da cirurgia e nas áreas de necrose que se apresentavam cobertas com fibrina e sangue coagulado.

Wish, em 1997, sintetizou dados sobre a situação da aplicação de laser de baixa intensidade, em tecidos moles. O autor cita o aumento das pesquisas envolvendo a aplicação da tecnologia laser na prática odontológica nos últimos dez anos, relatando que os aparelhos de laser de alta intensidade são de grande aplicabilidade clínica. Deve-se, porém, considerar ainda o elevado custo e também que seu emprego indiscriminado pode levar a injúrias teciduais causadas pelo aumento excessivo da temperatura, o que ainda limita de certa maneira sua aplicação em larga escala. Paralelamente, existem os aparelhos de laser de baixa intensidade que se encontram em outra região do espectro eletromagnético, como os aparelhos de laser semicondutores, que são compactos, de baixo custo e com grande eficiência óptica e elétrica. Em Medicina e Odontologia, os aparelhos de laser de diodo têm sido utilizados em situações que visam efeitos bioestimulantes. Neste artigo são citadas as várias utilizações para esse tipo de terapia: aceleração dos processos de reparação, aceleração da remodelação e reparo ósseo, restabelecimento da função neural após injúria, normalização da função hormonal, estimulação da liberação de endorfina e regulação do sistema imunológico. A penetração da energia laser usada na terapia de baixa intensidade poder penetrar nos tecidos a uma profundidade de 5 a 10 mm, quando as estruturas superficiais e profundas podem ser atingidas, contudo, ao penetrar no tecido, a energia sofre uma múltipla dispersão ou espalhamento pelos eritrócitos e microvasos e, conseqüentemente, o fluxo sanguíneo e a distribuição dos microcapilares irão demonstrar influência marcante na distribuição da energia laser.

Reddy, Stehno-Bittel e Enwemeka (1998), avaliaram a influência da fotoestimulação do laser na produção de colágeno em tendões de Aquiles de coelhos, tenotomizados e reparados. Após a tenotomia e o reparo, os membros traseiros dos coelhos foram imobilizados com talas de poliuretano adaptadas. Os animais do grupo experimental foram tratados com aplicação de laser de HeNe diariamente, com doses de 1 J/cm^2 , durante 14 dias. Os animais do grupo controle não foram irradiados. No quinto dia pós-operatório, as talas foram removidas. A análise bioquímica dos tendões revelou um aumento de 26% na concentração de colágeno no grupo tratado, indicando reparação mais rápida, quando comparado ao grupo controle. Os resultados sugeriram que a taxa de *Turnover* do colágeno nos tendões irradiados foi mais alta, quando comparado ao grupo controle.

Bradley, Groth e Rajab, mostraram, em 1998 que o tratamento por meio da terapia com laser de baixa potência emprega, na maior parte das vezes, o laser de arseneto de gálio e alumínio, com comprimento de onda de 830nm. Experimentos mostraram que a irradiação a laser na faixa do infravermelho pode penetrar no osso e no dente, produzindo efeitos terapêuticos quando aplicados com correta densidade de potência, postulando que existe um grande potencial nesta terapia, quando utilizada sobre estes tecidos. Baseando-se nos estudos de penetração da radiação, os autores apresentaram uma série de relatos clínicos sobre a utilização com eficácia do laser de baixa potência sobre processos algícos como: pulpites dentárias agudas, sinusopatia aguda, fraturas mandibulares dolorosas, dores ósseas provocadas por metástase de carcinoma oral.

Friedsen et al., em 1999, avaliaram e compararam a reparação óssea em nível histológico, em osteotomias em tíbias de coelhos criadas com broca e com laser duro. Uma reparação progressiva foi observada até o vigésimo primeiro dia

pós-tratamento em todos os grupos, no entanto, o grupo tratado com o laser exibiu um atraso na reparação, que pareceu estar relacionado com a queimadura provocada durante o uso do laser, mas a remodelação óssea pareceu se alterar para melhor pela irradiação com laser.

Romanos e Nentwig, em 1999, avaliaram a aplicação do laser de diodo na reparação de cirurgia oral de tecido mole, sendo os tipos de cirurgias: excisão de tumores de tecido mole, frenectomias, excisão de hiperplasia gengival, vestibuloplasias, remoção de hemangioma e cirurgia de periimplantite. O laser foi usado no modo contínuo e pulsátil, com e sem contato com o tecido mole. Como resultados, observaram que as propriedades da coagulação, associados com o uso do laser de diodo, foram particularmente benéficos durante a remoção de lesões vasculares. As vantagens pós-operatórias como: controle de edema, sangramento e dor; formação de cicatriz; e uma boa reparação foram observadas em todas as aplicações clínicas, e eram dependentes somente dos parâmetros físicos do laser usado. Sendo assim, concluíram que a aplicação do laser de diodo em procedimentos cirúrgicos orais e maxilofaciais parece ter efeito benéfico para a prática diária.

Ribeiro, em 2000, investigou o efeito da luz laser de HeNe, de baixa intensidade, linearmente polarizada no processo de reparação tissular de lesões de pele de animais de experimentação. A polarização linear do laser foi alinhada paralela e perpendicular à uma direção referencial no animal, tal como o eixo da coluna vertebral. As lesões consistiam de queimaduras com N₂ líquido criadas na parte inferior do dorso dos animais. Foram feitas quatro irradiações, nos dias 3, 7, 10 e 14 após a criação da ferida, na dose de 1J/cm². As lesões controle não foram irradiadas. Verificou-se que a polarização linear é mantida nas camadas superficiais

da pele e que ela pode ser melhor preservada na pele lesada, quando comparada a pele sadia. A análise do processo de reparação foi realizada por microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e pela técnica radioautográfica. Os resultados obtidos indicaram que o processo de reparação de lesões de pele irradiadas com luz laser HeNe é influenciado pela direção da polarização. Experimentalmente, verificou-se que, nas condições utilizadas neste estudo, a luz polarizada pode ser preservada nas primeiras camadas da pele. Além disso, o grau de polarização linear foi mais preservado nas amostras patológicas quando comparado às amostras de pele sadia, portanto a direção de polarização da radiação laser de HeNe pode acelerar a resposta biológica durante a reparação de queimaduras, na pele de ratos e camundongos.

Blay, em 2001, estudou os efeitos da radiação laser de baixa intensidade no mecanismo de osseointegração de implantes, mostrando que seu uso acelera a osseointegração.

Silveira, em 2001, selecionou 20 pacientes com enfermidade periodontal necessitando de tratamento periodontal cirúrgico do tipo ressectivo, pela técnica de gengivectomia, que consiste em remover todo o excesso de tecido gengival com finalidade de restabelecer a anatomia e também a parte funcional. O tecido gengival foi irradiado com diferentes tipos de feixe de laser para avaliação de possíveis alterações histológicas que pudessem ocorrer, principalmente quando se refere ao comportamento dos mastócitos, responsável entre outras alterações, pela dilatação dos vasos. Durante a intervenção cirúrgica, irradiação de laser de baixa intensidade de emissão infravermelha ($\lambda = 785 \text{ nm}$) e vermelha ($\lambda = 688 \text{ nm}$) foram usados, ambos com 50 mW de potência e fluência de 8 J/cm^2 , como também fragmentos que não receberam nenhum tipo de irradiação. Por meio da análise dos resultados,

o autor concluiu que: 1. dos mastócitos presentes, a proporção de degranulação foi significativamente maior nas regiões submetidas a aplicações de laser, independentemente dos dois comprimentos de onda utilizados; 2. não houve diferença significativa da ação do laser entre os diferentes comprimentos de onda ($\lambda=785\text{nm}$) e ($\lambda=688\text{ nm}$), ambos com 50mW de potência e fluência de 8 J/cm² sobre a degranulação de mastócitos, pois ambos resultaram num índice de degranulação similar; 3. com relação às medidas de comprimento e largura de vasos, escolhidos aleatoriamente nos campos de mensuração, não houve diferenças estatisticamente significantes.

Bornstein et al., em 2003, relataram que desde o início dos anos 60, o laser de CO₂, tem sido rapidamente introduzido em pesquisas médicas e em quase todas as especialidades cirúrgicas da medicina e da Odontologia. Em cirurgias dentais ele é principalmente usado para aplicações em tecido mole, e em lesões estomatológicas tem sido um método de escolha, enquanto que para outras lesões a evidência para seu uso ainda não é suficiente. Na primeira parte deste estudo é discutido os aspectos típicos da reparação da ferida, seguido da aplicação do laser de CO₂, comparando com biópsias convencionais. O estudo mostrou que houve melhora na cicatrização de feridas de tecidos moles qualitativamente.

Dyson, em 2004, relatou que a terapia com laser de baixa intensidade pode estimular a reparação tecidual e o alívio da dor e não produz um aquecimento fisiológico significativo. Cita seus efeitos na cicatrização da ferida, como: aceleração da resolução da inflamação aguda, aumento da liberação de fatores de crescimento, síntese de ATP aumentada, aumento dos mastócitos e da degranulação dos tecidos injuriados, aumento na proliferação de queratinócitos, fibroblastos e endoteliócitos, aumento da angiogênese, aumento da síntese de colágeno e aumento da atividade

fibroblástica, resultando numa contração cicatricial mais rápida. E seus efeitos no alívio da dor, com: alteração do limiar da dor, alteração neuroquímica no sistema nervoso periférico e central. Mas há necessidade de mais pesquisas clínicas para avaliar a efetividade dos comprimentos de onda e a densidade da radiação laser.

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

- Bisturi Circular (punch) NOBELBIOCARE®, USA.
- éter
- Pinça dente de rato
- cabo de bisturi nº 5
- Lâmina de Bisturi Nº 12
- Papel Filtro
- Minilaser 2075 F dent, Helbo, 2003, Munique, Alemanha
- Formol 10%
- Hematoxilina eosina

4.2 Métodos

Nesta pesquisa foram utilizados 32 ratos, fêmeas, adultos(± 4 meses), com ± 250 g cada, da raça Wistar provenientes do UNITOX da UNISA com controle de linhagem e origem segundo padrões de experimentação. A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética da UNISA, parecer nº 193/2005 (Anexo I).

Os ratos foram mantidos em gaiolas separadas até o final do estudo, sob supervisão veterinária e receberam dieta de acordo aos padrões do UNITOX e água "ad libitum".

plasmócitos, fibroblastos, neutrófilos polimorfonucleares ou outras células que indicam a inflamação, assim como, em todas as feridas foi averiguado o grau de epitelização e quantas camadas haviam nas diversas feridas.

TABELA 1

N	GRUPO	SUBGRUPO	DATA DA COLETA
4	A(CONTROLE)	A1	3 DIAS
4	A(CONTROLE)	A2	5 DIAS
4	A(CONTROLE)	A3	7 DIAS
4	A(CONTROLE)	A4	10 DIAS
4	B(LASER)	B1	3 DIAS
4	B(LASER)	B2	5 DIAS
4	B(LASER)	B3	7 DIAS
4	B(LASER)	B4	10 DIAS

PERÍODO DE REALIZAÇÃO DAS BIÓPSIAS PÓS CIRURGIA, SEGUNDO OS GRUPOS.



Figura 1- Apresentação da gaiola onde os ratos foram mantidos.



Figura2- Ratos já submetidos ao punch de 5mm de diâmetro

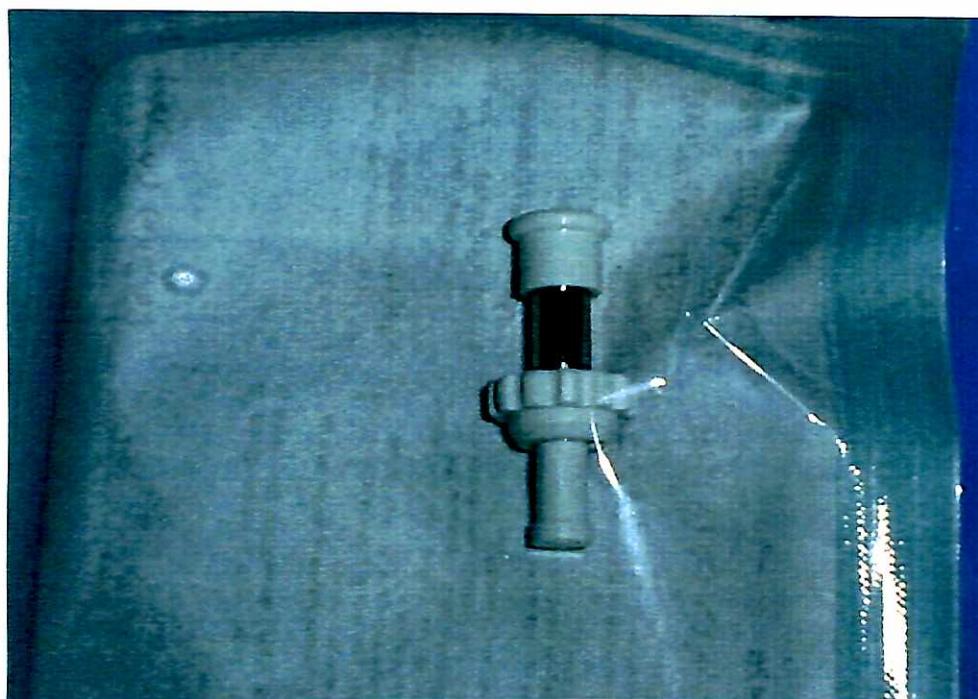


Figura 3- Bisturi circular "punch" NOBELBIOCARE®



Figura 4- Aspecto da realização da incisão para remoção do tecido do dorso do rato.



Figura 5- Área incisada após a utilização do bisturi circular.



Figura 6- Aspecto de um animal sedado já submetido a incisão.





Figura 7- Aparelho de Laser utilizado MINILASER 2075 F dent e Óculos de proteção .



Figura 8- Aplicação do laser na ferida cirúrgica do dorso de um dos espécimes.



Figura 9- Aplicação em outro espécime mostrando a distância de 0,5 cm.



Figura 10- Tecido Biopsiado de um dos animais sobre o papel filtro.

5.Resultados

Para uma melhor compreensão, os resultados estão apresentados separadamente divididos por períodos de biópsias entre grupo controle e experimental, enfocando o que predominou nos achados histológicos nos 2 grupos.

5.1. Biópsias aos 3 dias

5.1.1. Grupo Controle

Aos três dias do experimento observa-se a presença de um tecido conjuntivo do tipo frouxo, com a tendência para um tecido conjuntivo fibroso, onde pode-se notar fibras colágenas orientadas em várias direções, caracterizando um tecido conjuntivo denso não modelado. Observa-se, nas porções laterais da ferida a concentração de células que caracterizam um infiltrado do tipo plasmolinfocitário (caracterizando uma inflamação crônica, figura 11). No local da reparação da ferida nota-se a presença de um processo inflamatório devido a uma reação traumática do tecido e também a presença de uma vascularização intensa (vasos congestos).

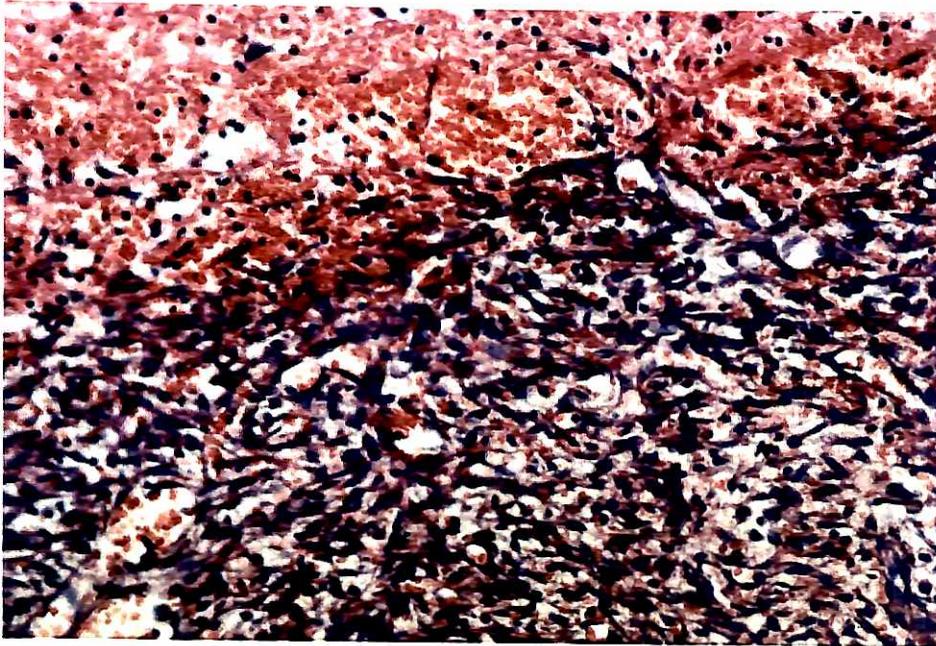


Figura11- Infiltrado Linfoplasmocitário. Aumento 20x. HE

Com maiores detalhes nota-se a orientação das fibras colágenas em várias direções e uma concentração de células do tipo fibroblasto, plasmócito, neutrófilos (PMN) e a presença de capilares congestionados denotando um processo inflamatório agudo.

5.1.2. Grupo experimental

Aos três dias da fase experimental observa-se que houve uma orientação das fibras colágenas, provocando uma concentração maior das mesmas, com a presença de fibroblastos e de células tipo linfócitos e plasmócitos que caracterizam um processo de inflamação crônica.

Numa maior ampliação, observa-se uma orientação das fibras colágenas com uma melhor organização provocando uma melhor concentração no tecido,

e há a presença de fibroblastos no interior do tecido em reparação, conforme a figura 12.

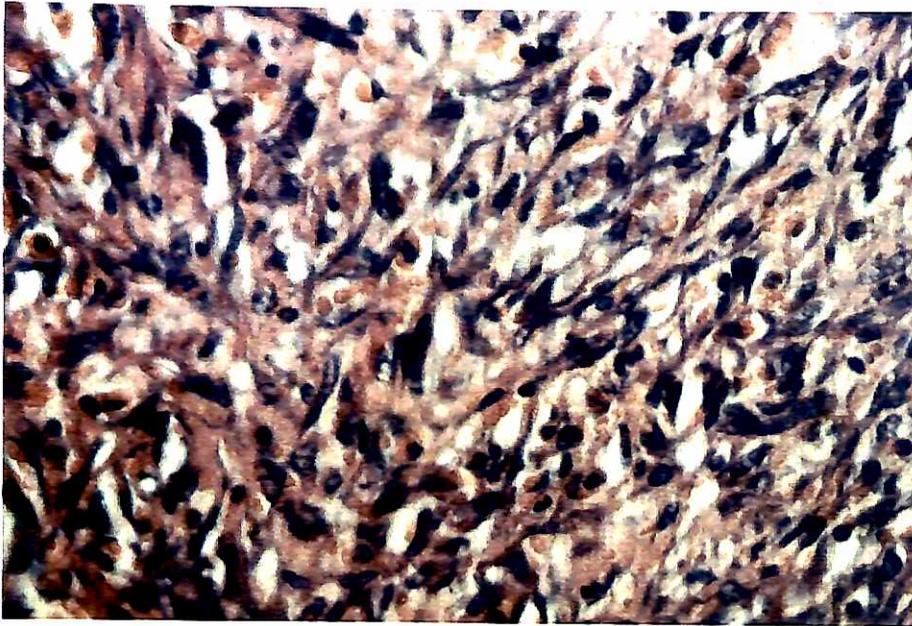


FIGURA 12- Fibras com melhor orientação do que o grupo controle. HE.

5.2. Biópsia aos 5 dias

5.2.1. Grupo Controle

Aos cinco dias, observa-se a presença de um tecido conjuntivo denso com fibras colágenas orientadas em várias direções e a presença de vários tipos celulares, tais como: fibroblastos, plasmócitos, neutrófilos e polimorfonucleares (PMN) e a presença de uma vascularização intensa (Figura 13) , com a presença de capilares congestionados e a presença da migração epitelial das bordas para o centro da ferida, ainda não epitelializado.

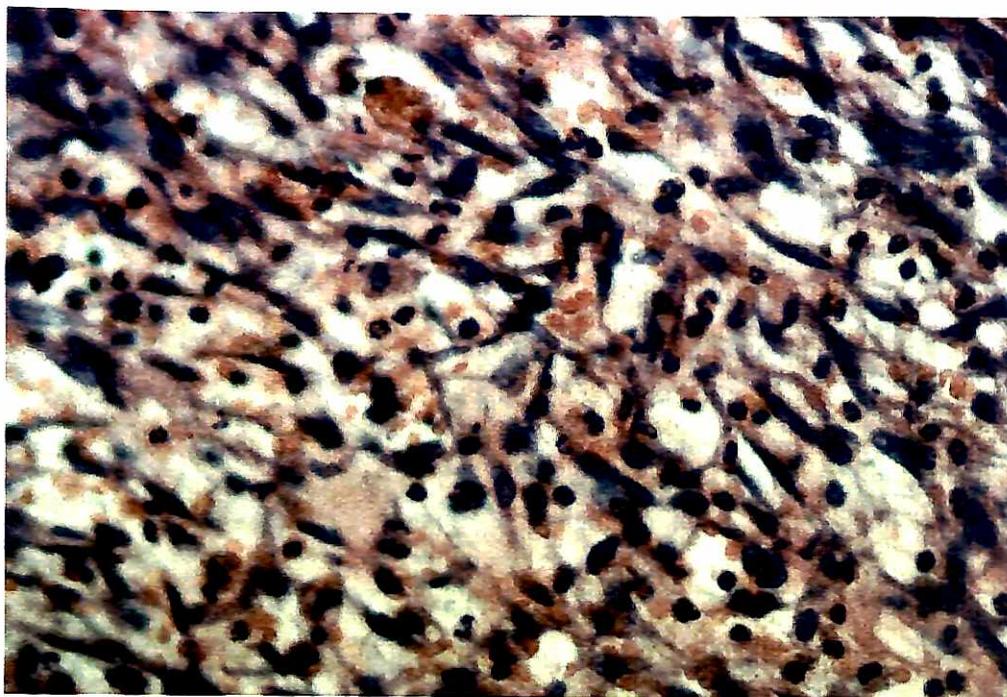


Figura 13- Fibroblastos, Plasmócitos , Polimorfonucleares e vasos congestos. Aumento 40X. HE.

Nas observações com maiores detalhes da reparação, nota-se, com certa predominância, a presença de fibroblastos com intensa atividade secretora, onde as fibras colágenas apresentam-se com vários graus de polimerização e uma vascularização intensa denotando um processo inflamatório crônico.

5.2.2. Grupo Experimental

Aos cinco dias, o tecido epitelial apresenta-se com uma projeção maior que no grupo controle. A epitelialização apresenta-se quase completa, com ínfima porção central do tecido conjuntivo exposto. A membrana conjuntiva (derme) apresenta-se constituída por feixes colágenos em vários graus de

epitelialização, onde as fibras estão em várias direções, e no seu interior observa-se a presença de células como fibroblastos, Figura 14.

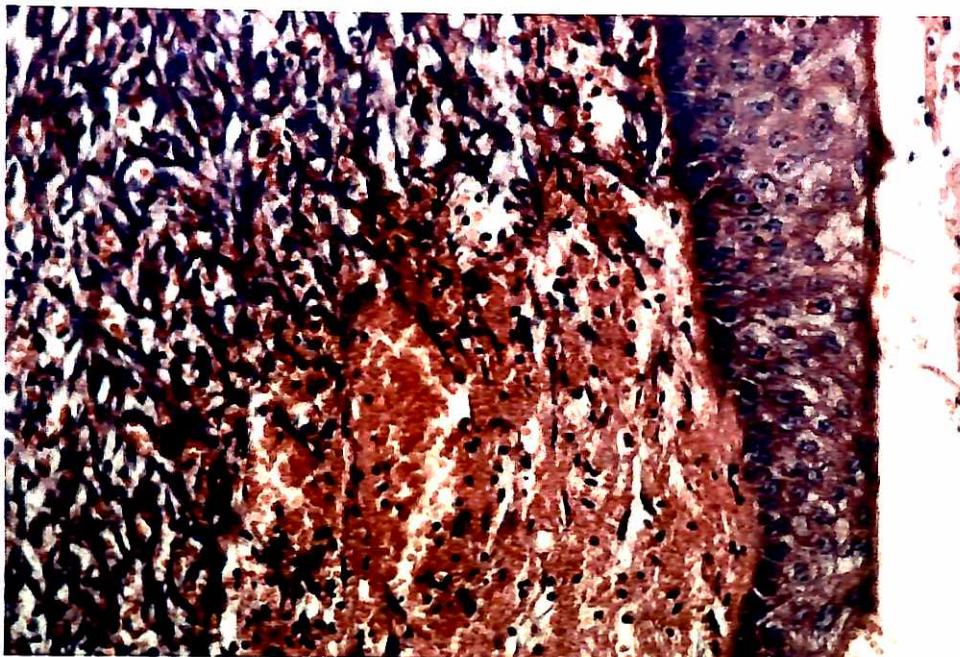


FIGURA 14- Epitélio formado em todas camadas. aumento 20x. HE

Com maiores detalhes, a célula predominante é do tipo fibroblástica como característica de atividade secretora (apresentando os núcleos de cromatina frouxos e uma basofilia citoplasmática). O tecido epitelial em formação é constituído por várias camadas, porém, não se observa a definição das respectivas, com ausência de queratina. A junção entre o epitélio e o conjuntivo é formada por uma estrutura celular de característica acidófila, possibilitando a integração entre epitélio e o conjuntivo.

5.3. Biópsias aos 7 dias

5.3.1. Grupo Controle

Aos sete dias do experimento, no tecido conjuntivo da ferida em reparação, nota-se a presença de fibras colágenas com vários graus de polimerização, fibroblastos e a presença de vasos. Em relação ao tecido epitelial, observa-se que as porções periféricas do tecido se apresentam com características de reparação, tentando uma projeção para fechar a parte central da ferida, esta se formou com uma espessura maior, determinando as camadas do epitélio, com ausência da camada granulosa.

Com maior aumento nota-se a presença das camadas epiteliais em evidência(camada basal e espinhosa, com vários extratos celulares).

5.3.2. Grupo experimental

Com sete dias do experimento, o epitélio já se encontra totalmente formado, ainda no sentido de fechar a ferida. E o tecido conjuntivo mais compacto, com áreas de concentração celular e orientação dos feixes colágenos.

Em maiores detalhes, observa-se a epiderme com tecido epitelial totalmente formado, com células totalmente diferenciadas, apresentando grânulos citoplasmáticos(querato-hialina). A camada espinhosa já se apresenta formando pequenas papilas para o interior da derme. A derme já se

apresenta formada por feixes colágenos orientados em várias direções, caracterizando um tecido conjuntivo denso não modelado e uma vascularização intensa.

5.4. Biópsias aos 10 dias

5.4.1. Grupo Controle

Com dez dias da fase experimental, a epiderme, ou seja, o tecido epitelial, apresenta suas camadas definidas, formando um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. O tecido conjuntivo se apresenta totalmente diferenciado, formado por feixes colágenos e fibras colágenas em várias direções e a presença de fibroblastos e uma vascularização menos intensa que os estágios anteriores.

Com maior detalhe, a epiderme apresenta o epitélio com as respectivas camadas: camada córnea, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal e o tecido conjuntivo totalmente diferenciado, como descrito acima.

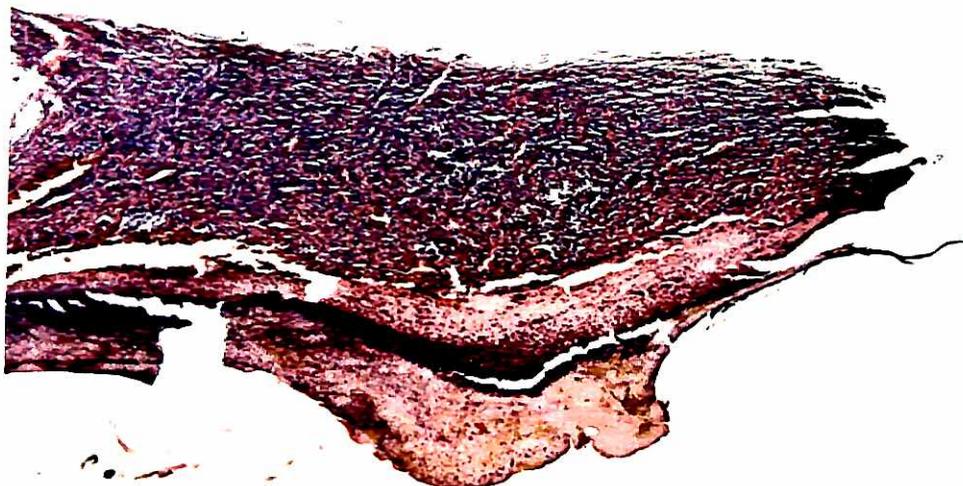


FIGURA 15- Grupo controle dez dias- aumento 4x . HE

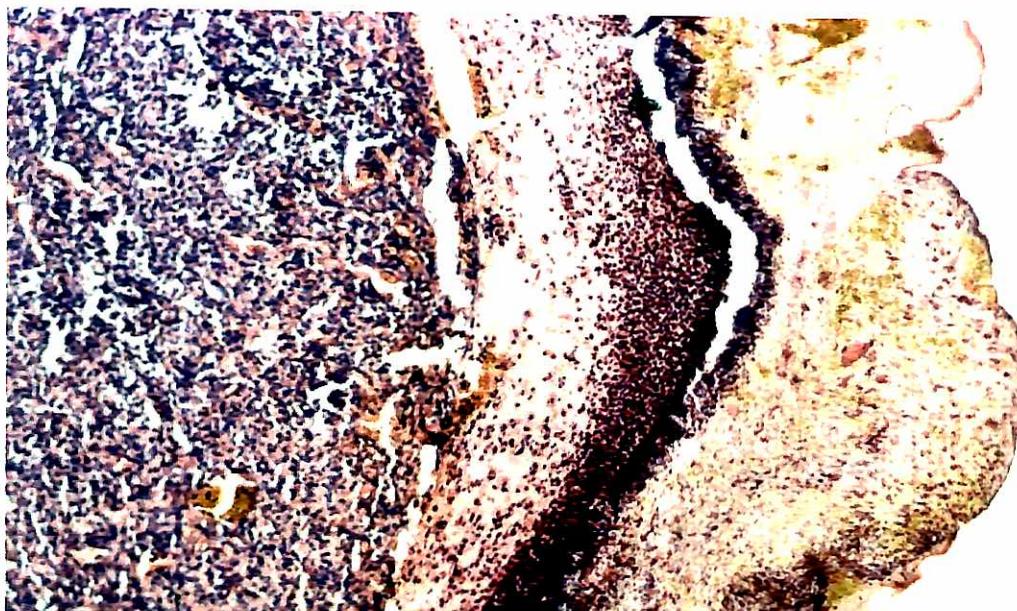


FIGURA 16- Grupo controle dez dias- Aumento 10 x. HE.

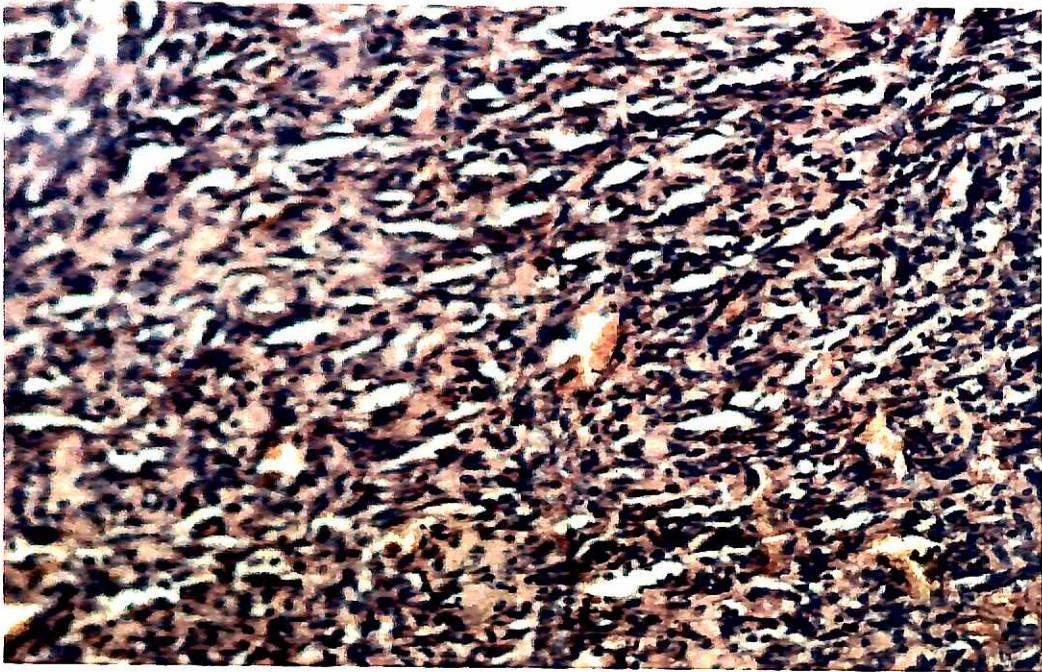


FIGURA 17- Grupo controle dez dias- Aumento 20x. HE.

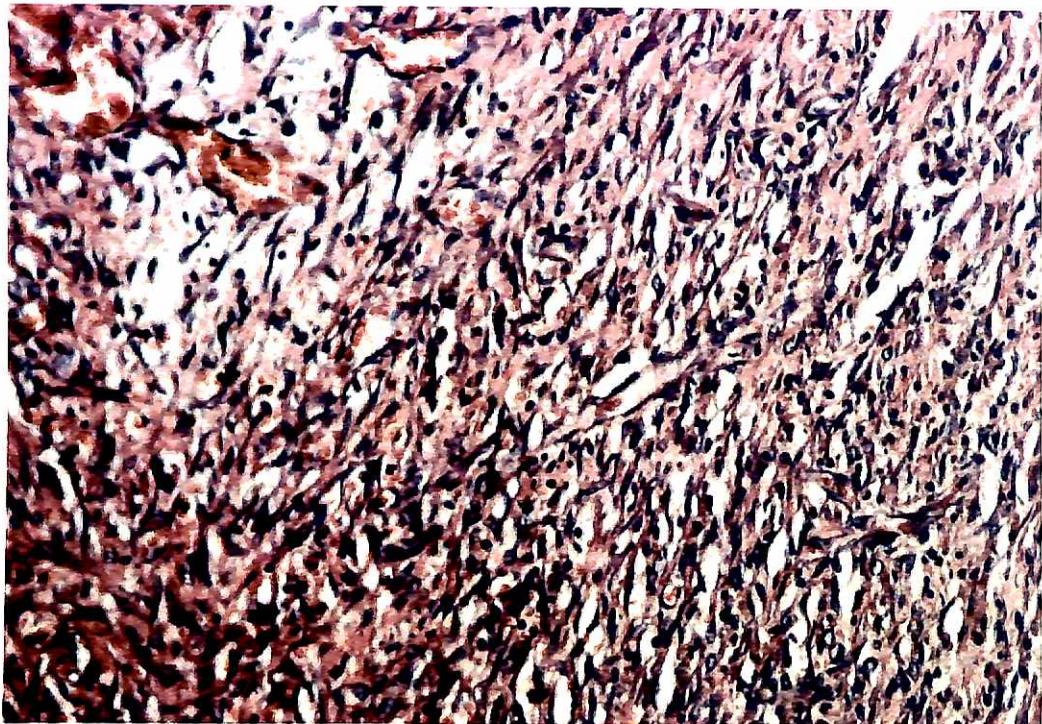


FIGURA 18- Grupo controle dez dias – Aumento 20x. HE.

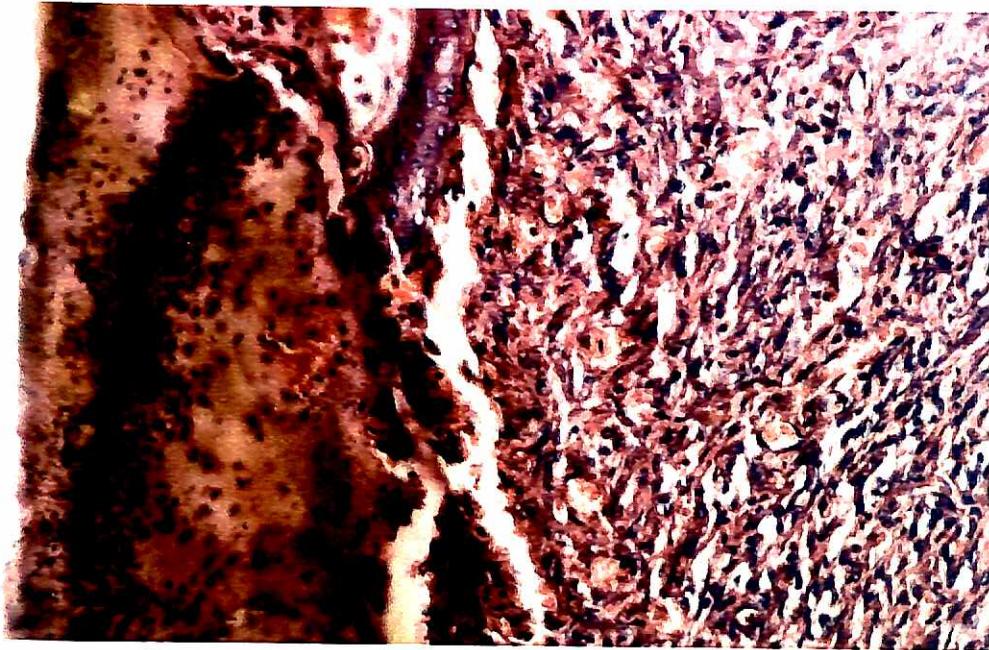


FIGURA 19- Grupo controle 10 dias- Aumento 20 X. HE.

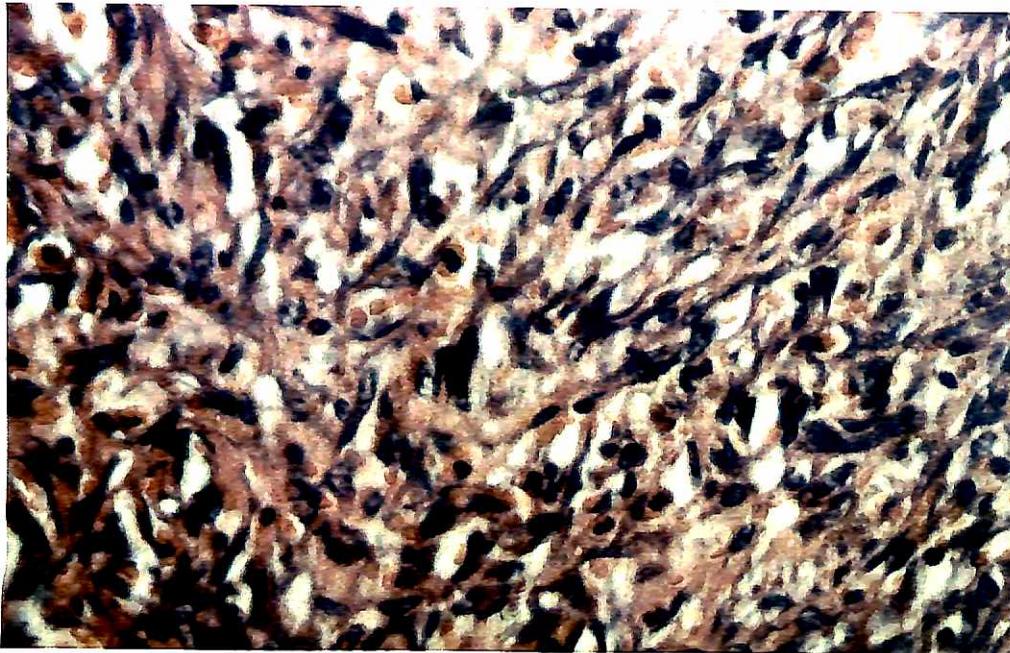


FIGURA 20- Grupo Controle dez dias- Aumento 40x. HE.

5.4.2. Grupo Experimental

Aos dez dias do experimento conforme figuras de 21 à 24, a queratina se apresenta com todas as camadas diferenciadas, isto é, camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea. A derme, uma membrana constituída por tecido conjuntivo denso, não modelado e com a presença de vasos congestos.

Com um maior aumento, o epitélio já está em processo acentuado de secreção de grânulos de queratina, A derme já se apresenta mais densa predominantemente com células fibroblásticas.



FIGURA 21- Grupo experimental dez dias- Aumento 4 x. HE.

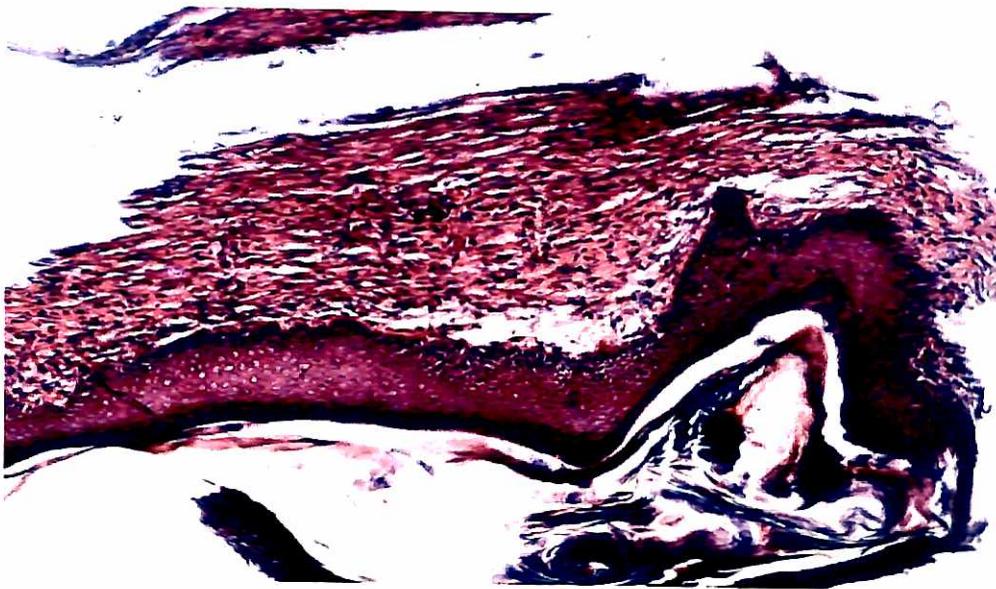


FIGURA 22- Grupo experimental dez dias- Aumento 10 x. HE.

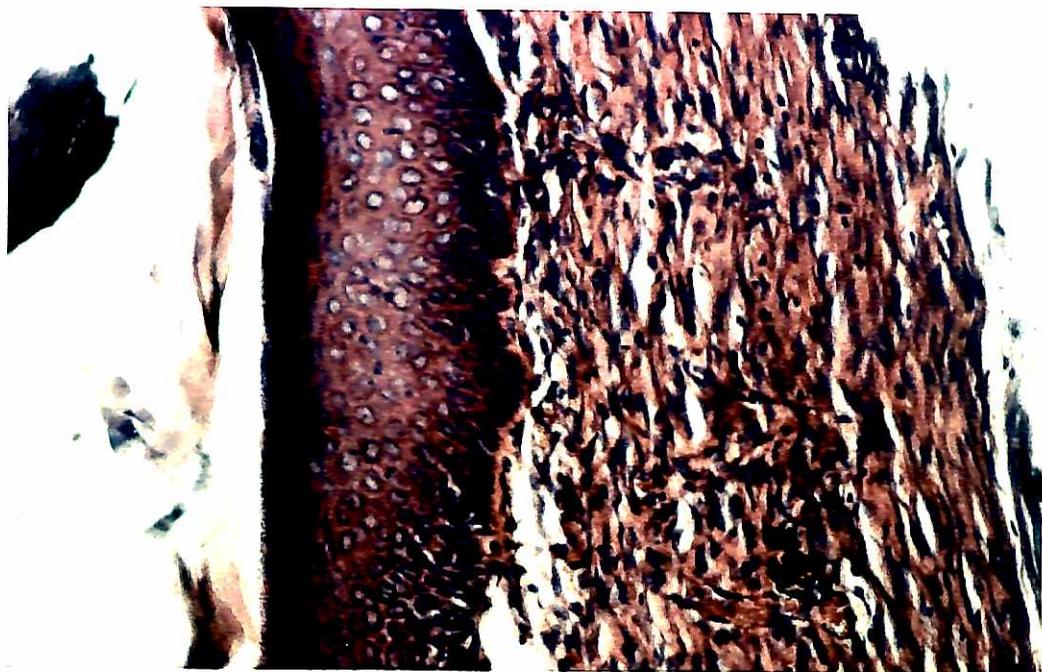


FIGURA 23- Grupo experimental 10 dias- Aumento 20x. HE.

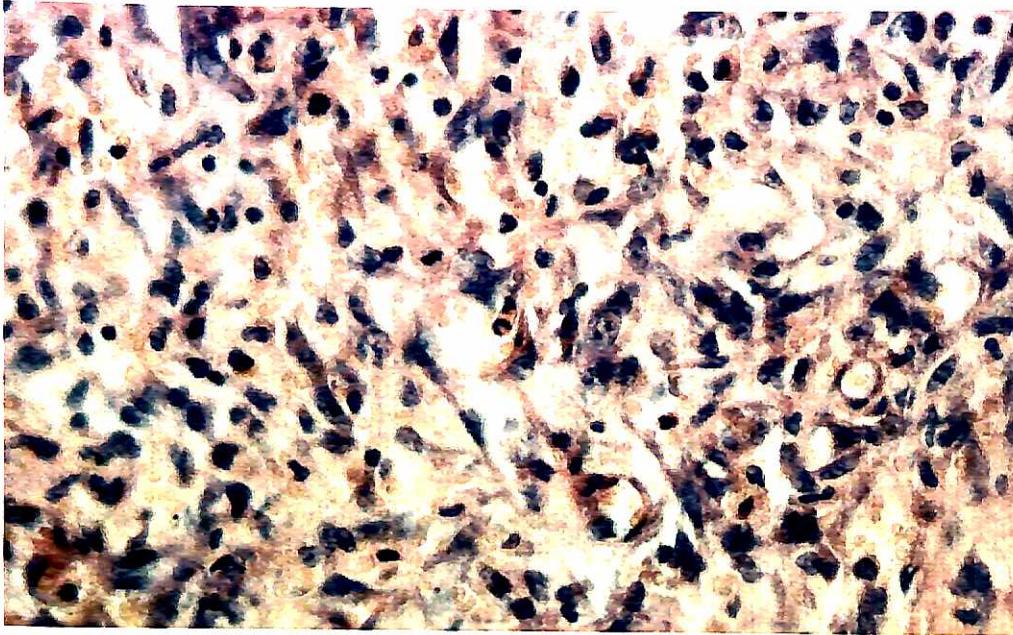


FIGURA 24- Grupo experimental 10 dias- Aumento 40x- HE

6. Discussão

Analisando os resultados desta pesquisa e comparando os resultados entre os grupos controle e experimental com os dados da literatura pode-se discutir o que se segue.

Aos três dias da cirurgia no grupo experimental, houve uma melhor orientação das fibras colágenas provocando uma maior concentração destas no tecido conjuntivo, com a presença de fibroblastos, no interior do tecido em reparação, e de células que caracterizam um processo inflamatório, como linfócitos e plasmócitos. Isto mostra pouca diferença em relação ao grupo controle, onde a situação difere apenas na orientação das fibras colágenas, isto é, estando menos orientadas no grupo controle.

Aos cinco dias do experimento, notou-se que no grupo irradiado a projeção do tecido epitelial das bordas para o centro da ferida foi maior do que no grupo controle, mas este epitélio ainda não se apresentou com suas camadas definidas, com apenas uma porção central do conjuntivo exposto. Estes resultados estão coerentes com Mester et al. (1971) que relataram que o laser estimulou o crescimento epitelial e com Trelles et al. (1989) que mostraram que o laser acelera a reprodução e a maturação das células epiteliais. O tecido conjuntivo em ambos os grupos apresentou-se constituído por feixes colágenos em vários graus de epitelialização, e a célula predominante é a do tipo fibroblástica com característica de atividade secretora, como observaram Reddy, Stehno-Bittel e Enweneka (1998) e Dyson (2004).

Já com sete dias de acompanhamento do grupo experimental, o epitélio já se encontra bem pronunciado, mas ainda no sentido de fechar a ferida. O que o diferencia do grupo controle, pois as células epiteliais estão totalmente diferenciadas, com a presença de grânulos citoplasmáticos, dando assim, início para a formação de queratina, nota-se também, que no grupo experimental há uma invaginação da camada espinhosa para o interior do tecido conjuntivo, o que não ocorre no grupo controle. No grupo controle notou-se a ausência da camada granulosa e da camada córnea, presentes no grupo experimental, esta camada é mais compacta, caracterizando um tecido conjuntivo denso, não modelado.

Com dez dias do grupo experimental, o tecido epitelial apresenta suas camadas definidas, formando um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, isto, é, com todas as suas camadas: camada córnea, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal. Sendo que no grupo controle, a queratina, ou a camada córnea é uma massa e no grupo experimental esta é filamentosa, caracterizando a queratina da pele. O tecido conjuntivo também é totalmente diferenciado, formado por feixes colágenos. As maiores diferenças são que no grupo experimental o epitélio está num processo acentuado de secreção de grânulos de queratina e a derme se apresenta mais densa, com a predominância de células fibroblásticas.

Sendo assim, como descrito acima, tendo o tecido conjuntivo se organizado melhor e o epitélio ficado com suas camadas mais definidas, isto pode ser uma característica extremamente benéfica para a reparação da ferida. Pois, com a organização mais rápida do tecido conjuntivo e a maior migração do tecido epitelial para o centro da ferida, com a intenção de fechá-la, se torna

de grande ajuda em situações onde se precisa do isolamento mais rápido possível do meio interno para o externo. Estas situações podem ser encontradas em: cirurgias muco-gengivais, e maturação de mucosa de revestimento quando se realiza implantes, técnica reconstrutivas de osso e levantamento de seio. Nestas situações onde há demora para ocorrer o selamento do epitélio, pode-se deparar com infecções da parte interna da ferida, tornando-as mais difíceis de se reparar e comprometendo o resultado do procedimento cirúrgico.

Os resultados encontrados nesta pesquisa, indicam uma tendência de reparação mais rápida no grupo experimental com laser.

De acordo com o trabalho de Herrero(1986), é possível aumentar a dose até $15\text{J}/\text{cm}^2$, para ver se existe um efeito mais notável na reparação tecidual do que com $10\text{J}/\text{cm}^2$, já que este autor diz que a dosimetria não deve ultrapassar estes $15\text{J}/\text{cm}^2$. Em função disto nesta pesquisa utilizou-se $16\text{J}/\text{cm}^2$ pois para a terapia através de sessão única seria uma dosagem apropriada, já que o aparelho utilizado (Minilaser 2075 F dent) apresenta o tempo de exposição do laser e sua fluência padronizados em 4 minutos a potência de $4\text{ J}/\text{cm}^2$.

Vale a pena ressaltar, que se outra pesquisa fosse realizada, poderia ser aumentado o número de aplicações do laser, conforme o relatado por Mester et al.(1971), que aplicaram o laser com três, sete e dez dias de pós-operatório, e Ribeiro(2000), que usou o laser com três, sete, dez e catorze dias depois da criação da ferida.

De toda forma, é digno de nota, que segundo as observações obtidas nesta pesquisa, a partir do décimo dia, os resultados tendem a ser mais

homogêneos, mostrando que em ratos, após os dez dias, os efeitos reparativos observados no grupo controle e no grupo experimental se equiparam.

O desafio para os pesquisadores que lerem este trabalho e continuarem nesta linha de pesquisa, é determinar em cada animal a relação ideal entre a potência por cm^2 e a frequência da aplicação do laser. Desta maneira, esta pesquisa abre a possibilidade de que outras investigações venham a ser realizadas para esclarecer o papel efetivo da aplicação da radiação laser na reparação dos tecidos biológicos.

7.Conclusão

Os resultados observados neste trabalho permitem concluir que:

O uso do laser de baixa potência de 680 nm acelerou a reparação de feridas de tecido mole em ratos após única aplicação $16\text{J}/\text{cm}^2$ em comparação com a ausência de sua aplicação.

REFERÊNCIAS¹

ARCORIA C J, STEELE R E, VITASEK B A, WAGNER M J. Effects of Coaxial CO₂/Nd:YAG Irradiation on Periodontal wound healing. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 12, p. 401-409, 1992

BLAY A. , Efeitos da radiação laser em baixa intensidade no mecanismo de osseointegração de implantes: Estudo "in vivo". **Dissertação de Mestrado**. Ipen/2001

Bornstein M M, SUTER V G A, STAUFFER E, BUSER D. Le laser au CO₂ en stomatologie 1^{er} partie. **Pratique Quotidienne – formation complementaire**.

BRADLEY P F, GROTH E De B, RAJAB A. Low Intensity Laser Therapy for Hard Tissue Problems in the Oro-facial Region. **6 th International congress of Lasers in Dentistry**, p. 103-105.

CENTTY I G, BLANK L W, BERNARD A L, ROMBERG E, BARNES D M. Carbon Dioxide Laser for De-Epithelialization of Periodontal Flaps. **Journal of Periodontology**, v. 68, n. 8, p. 763-769, 1997.

CHOMETTE G, AURIOL M, ZEITOUN R, MOUSQUES T. Effet du soft-laser sur le tissu conjonctif gingival II – Effet sur la cicatrisation. Etude en microscopie optique, histoenzymologie et microscopie électronique, **Jour. Biol. Buccale**, v. 15, p. 51-57, 1987.

EDUARDO C De P, CECHINI S C, CECCHINI R C, Benefits of low power lasers on oral soft tissue. **Lasers in Dentistry II**, H.A. Wigdor, J. D. B. Featherstone, J. M. White, J. Neeve, eds.; Proc. SPIE, 2672:27-33.

EVERSOLE L R, RIZOIU I M. Preliminary Investigations on the Utility of an Erbium, Chromium YSGG Laser. **CDA Journal**, p.41-47, 1995.

FRIESEN L R, COBB C M, RAPLEY J W, FORGAS-BROCKMAN L, SPENCER P. Laser Irradiation of Bone: II. Healing response following treatment by CO₂ and Nd:YAG Lasers. **Journal of Periodontology**, v. 70, n. 1, 1999.

¹De acordo com NBR – 14724 e NBR – 6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2002. Abreviaturas de periódicos SESC (Serviços de Ciências da Saúde)

- GOULTSCHIN J, GAZIT D, BICHACHO N, BAB I. Changes in teeth and gingival of dogs following laser surgery: A block surface light microscope study. **Lasers in surgery and Medicine**, v. 8, p. 402-408, 1988.
- HOEXTER D L. Latest advances in laser systems and Periodontal surgery. **Dental Clinics of North America**, v. 45, n. 1, 2001.
- LEE P, KLIM K, KIM K. Effects of low incident energy levels of infrared laser irradiation on healing of infected open skin wounds in rats. **LILT Original articles**, 59, 64, 1993.
- LUKAUF M et al. Infrared laser soft tissue ablation versus ultraviolet excimer laser, Experimental introduction of the Hol: YAG-laser in oral surgery. **Oral surg. Oral med. Oral Pathol.** V. 76, p. 425-432, 1993.
- LUBART R. et al. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v. 12, p. 305-310, 1992.
- MESTER E , SPIRY T , SZENDE B , TOTA J G . Effect of laser rays on wound healing. **The American journal of surgery**, v. 122, p. 532-535, 1971.
- NARA Y et al. Stimulative effect of He-Ne laser irradiation on cultured fibroblasts derived from human dental pulp. **Lasers in the life Sciences**, v. 4(4), p. 249-256, 1992.
- KARU T. Photochemical effects upon the cornea, skin and other tissues. **Health Physics**, v. 56, n. 5, p. 691-704, 1989.
- PINHEIRO A L B et al. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. **Journal of Clinical laser medicine and surgery**, v. 21, n. 6, p. 383-388, 2003.
- POGREL M A ET AL. The carbon dioxide laser in soft tissue preprosthetic surgery. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 61, n. 1, p. 203-208, 1989.
- REDDY G K , STEHNO-BITTEL L , ENWEMEKA C S . Laser Photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers in surgery and Medicine**, v. 22, p. 281-287, 1998.
- 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. **Dissertação de mestrado**, Ipen/2000.
- RIGAU J, TRELLES M A , CALDERHEAD R G , MAYAYO E . Changes in fibroblasts proliferation and metabolism following *in vitro* Helium-Neon laser irradiation. **LILT Original articles**, p. 25-33, 1991.
- ROMANOS G , NENTWIG G-H . Diode laser (980 nm) in oral and maxillofacial surgical procedures: clinical observations based on clinical applications. **Journal of Clinical laser medicine & surgery**, v. 17, n. 5, p. 193-197, 1999.

ROMANOS G E et al. Removal of epithelium in periodontal pockets following Diode (980 nm) laser application in the animal model: An *in Vitro* study. **Photomedicine and laser surgery**, v. 22, n. 3, p. 177-183, 2004.

SILVEIRA L B. , Verificação do comportamento de mastócitos na parede não mineralizada da bolsa periodontal supra-óssea submetida à radiação laser de baixa intensidade, Ipen/2001.

TRELLES M A et al. Histamine & low power laser. **The journal of bloodless medicine & surgery**, v. 6, n. 1, p.15-16, 1988.

TRELLES M A et al. The action of low reactive level laser therapy (LLLT) on mast cells : A possible pain relief mechanism examined. **LLLT Original articles**, p. 27-30, 1989.

WALSH L J . The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. **Australian Dental Journal**, v. 42, n.2, p. 247-254, 1997.

WATANABE H , ISHIKAWA I , SUZUKI M , HASEGAWA K . Clinical Assessments of the Erbium: YAG laser for soft tissue surgery and scaling. **Journal of Clinical laser medicine & surgery**, v. 14, n. 2, p. 67-75, 1996.

WHITE J M , GOODIS H E , ROSE C L . Use of the pulsed Nd:YAG laser for intraoral soft tissue surgery. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 11, p. 455-461, 1991.

ZAFFE D et al. Morphological, histochemical, and immunocytochemical study of CO₂ and Er:YAG laser effect on oral tissues. **Photomedicine and laser surgery**, v. 22, n. 3, p. 185-189, 2004.



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP



UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Comitê de Ética em Pesquisas
Registro CONEP n.º 306
Aprovado em 16/05/2000

PARECER N.º 193 /2005

REGISTRO CEP UNISA N.º 303/2004

Projeto de Pesquisa: Avaliação da aplicação do laser de baixa intensidade em ferida de tecido mole.

Responsável Pós- Graduando: Marcelo Vinicius Andrade Lima

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk

Área Temática Especial: Odontologia

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, cabe a seguinte consideração:

As informações apresentadas atendem aos aspectos fundamentais das Resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas da UNISA, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa, a ser desenvolvido em 32 ratos, da raça Wistar no UNITOX da Universidade de Santo Amaro-S.P.

São Paulo, 11 de fevereiro de 2005

PROF. DR. CARLOS DE SOUSA LUCCI
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas
UNISA - Universidade de Santo Amaro