

UNIVERSIDADE DE UBERABA
FABIANO MARTINS ALVES PINTO

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA FOTOBIMODULAÇÃO COM
LASER 660nm NA PERIODONTITE INDUZIDA POR
LIGADURA EM RATOS WISTAR**

Uberaba, MG

2015

FABIANO MARTINS ALVES PINTO

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA FOTOBIMODULAÇÃO COM
LASER 660nm NA PERIODONTITE INDUZIDA POR
LIGADURA EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade de Uberaba, área de concentração Biopatologia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior

Uberaba, MG

2015

Dedico este trabalho

À minha amada esposa Elizandra,
companheira incansável e dedicada nessa
minha jornada pelos meus objetivos, meu
porto seguro e razão de todo o meu amor
e carinho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus filhos Leonardo e Luanna; seus sorrisos e alegria me motivam cada dia mais a perseguir meus sonhos e lhes ensinar o caminho do bem.

Aos meus pais Cecília Martins da Costa Pinto e Vanderlei Alves Pinto. Apesar da ausência de tantos anos sinto vocês próximos e confiantes no meu sucesso.

À minha querida tia Edila. Pelo amor incondicional e por acreditar sempre no meu potencial, apoiando e incentivando todos os meus sonhos e objetivos de vida. Fazendo por mim o papel de pai e mãe que me conforta tanto. A você, minha eterna gratidão e todo o meu amor.

Ao Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior meu orientador, por ter acreditado em mim e me dado a oportunidade de trabalhar com ele. Pelos ensinamentos, dedicação e seriedade que estão presentes no seu trabalho. Pela amizade na condução dos passos necessários a conclusão deste trabalho. Um exemplo na orientação e conduta científica.

À Profa. Dra. Sanívia Aparecida Lima Pereira pela grande ajuda neste meu trabalho, amizade e paciência em transmitir o conhecimento quando muito precisei. Meu muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino pela presteza no auxílio aos materiais de pesquisa, pela amizade e bons conselhos durante a execução deste trabalho.

Aos amigos técnicos do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Uberaba, em especial aos técnicos Aline , Rayane e Luiz Fernando pela ajuda imensurável.

Aos alunos de iniciação Científica da Universidade de Uberaba, em especial a Isabela Guimarães Teodoro pela imensa ajuda na condução dos trabalhos de laboratório.

Aos professores das disciplinas oferecidas, por todos os bons e sábios ensinamentos.

O importante é não parar de questionar.

Albert Einstein

RESUMO

O presente trabalho estudou o efeito da irradiação com luz laser 660nm em gengivas e mandíbulas de ratos Wistar induzidos a periodontite por ligadura. No experimento, foram utilizados 20 animais, sendo cinco animais controle (sem ligadura) e 15 animais submetidos à inserção de uma linha ao redor do primeiro molares direito e esquerdo (“ligadura”). Após uma semana, os animais submetidos à ligadura foram divididos em três grupos, a saber: Grupo evolução natural: animais que, após a remoção da ligadura, permaneceram em recuperação espontânea, sem laserterapia por sete dias. Grupo eutanásia imediata: Animais que foram eutanasiados imediatamente após a remoção da ligadura. Grupo LLLT: animais que, após a remoção da ligadura, receberam sessões diárias de laser (660 nm) por sete dias. As sessões de laser foram realizadas uma vez ao dia, sob anestesia geral, e fluência de $2,1 \text{ J/cm}^2$ no modo contínuo, aplicado de forma pontual ao redor da inserção gengival durante um minuto. Após a eutanásia dos animais, as gengivas e mandíbulas foram analisadas quanto a densidade de colágeno, leucócitos, mastócitos e células marcadas com anticorpos anti-IL-17 e foi avaliada a reabsorção óssea ao redor da raiz méso-vestibular dos primeiros molares inferiores esquerdo e direito. Mandíbulas e gengivas foram submetidas a processamento histológico de rotina e coloração com pela hematoxilina-eosina. Gengivas também foram coradas para identificação de mastócitos (fucsina ácida) e colágeno (picro sírius), além de tratamento imunohistoquímico contra IL-17. A utilização da LLLT, com comprimento de onda de 660nm induziu um aumento na densidade de colágeno, sugerindo que a laserterapia induz a formação de colágeno, aumenta a densidade de leucócitos, indicando uma ação pró-inflamatória nas condições testadas, também um significativo aumento na densidade de mastócitos, sugerindo o potencial da LLLT no recrutamento deste tipo celular. Houve aumento nas células marcadas com anticorpo anti-IL-17. No entanto, não houve efeito significativo na profundidade de reabsorção óssea em relação ao grupo de evolução natural. Podemos concluir que a LLLT com laser de 660nm e $2,1 \text{ J/cm}^2$ tem um efeito pró-inflamatório uma vez que induziu aumento na densidade leucócitos, mastócitos e células marcadas por anticorpo anti-IL-17 nas gengivas de ratos Wistar induzidos a periodontite. Além disso, a LLLT nas condições testadas tem o potencial de induzir a produção de colágeno, porém não tem o potencial para induzir reparação óssea, provavelmente pela indução da expressão de IL-17 um antagonista deste processo.

Palavras-chave: terapia laser de baixa intensidade, periodontite, fotobiomodulação.

ABSTRACT

This work studied the effect of 660nm laser light irradiation on Wistar rats gums and jaws induced to periodontitis by ligature. In the experiment, 20 animals were used, being 5 control animals (without ligature) and 15 animals subject to the insertion of a line around the lower first left and right molars (ligature). After one week, the animals subject to ligature were divided into three groups, being: natural evolution group: animals that, after the removal of the ligature remained in spontaneous recovery, without laser therapy for seven days; Immediate euthanasia group: Animals that have been immediately euthanized after removal of ligature; LLLT group: animals that, after the removal of the ligature, received daily sessions of laser (660 nm) for seven days. The sessions of laser were conducted once a day, under general anesthesia and 2,1 J/cm² fluency in continuous mode, applied in a punctual fashion around the gum insertion for one minute. After euthanasia of the animals gums and jaws have been analysed so as regarding collagen density, leukocytes, mast cells and cells marked with antibodies anti-IL-17 and bone reabsorption around mesiobuccal root of the lower first left and right molars was assessed. Jaws and gums have been subject to routine histological processing and staining by hematoxylin-eosin. Gums have been stained as well for the identification of mast cells (fuchsin acid) and collagen (picosirius), in addition to immunohistochemical treatment against IL-17. Using LLLT, with a 660nm wave length induced an increase in collagen density suggesting that laser therapy induces the formation of collagen, increases leukocyte density, indicating a pro-inflammatory action under tested conditions, as well as a significant increase in the mast cells density, suggesting LLLT potential for the recruitment of this type of cell. There has been an increase in cells marked with antibody anti-IL-17. However, there was no significant effect over bone reabsorption depth in relation to the natural evolution group. We are entitled to conclude that LLLT with 660nm laser and 2,1 J/cm² has a pro-inflammatory hence, it has induced increase in the leukocyte density, mast cells and cells marked with the antibody anti-IL-17 in gums of Wistar rats induced to periodontitis. Besides that, under the conditions tested, LLLT has the potential to induce collagen production, however it has no potential to induce bone repair, probably due to the induction of the expression of IL-17, an antagonist to this process.

Keywords: low level laser therapy, periodontitis, photobiomodulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema ilustrativo dos componentes do periodonto:	14
Figura 2 - Sinergia polimicrobiana e disbiose (estado alterado da ecologia microbiana na cavidade oral) em hospedeiros suscetíveis induz periodontite.....	15
Figura 3 - Imobilização do animal anestesiado sobre a mesa suporte.....	21
Figura 4 - Separação das ameias entre o primeiro e segundo molares utilizando uma lima endodôntica 40, abrindo espaço para a inserção da ligadura.	22
Figura 5 - Caneta laser operando em modo contínuo sobre a área dos dentes com as ligaduras.....	23
Figura 6 - Mandíbula já dissecada sem separar as metades direita e esquerda e eppendorf contendo formol tamponado a 10% e fragmentos retirados das gengivais da área dos primeiros molares inferiores dos animais.	24
Figura 7- Densidade de leucócitos/cm ² , analisada após sete dias com ligadura e diferentes tratamentos.	30
Figura 8 - Densidade de mastócitos/cm ² , analisada após sete dias com ligadura e diferentes tratamentos.	31
Figura 9 - Densidade de células marcadas por anticorpo anti-IL-17/cm ² , analisada após sete dias com ligadura e diferentes tratamentos após a retirada da ligadura:	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus Celsius

48/80 - Composto 48/80 é um polímero produzido por condensação de N - metIL-p - metoxifenetilamina com formaldeído.

ABP - Osso alveolar propriamente dito

ATP - Adenosina trifosfato

CEEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

COBEA - Colégio Brasileiro Experimentação Animal

COL 1 α 1 - Colágeno tipo 1 alfa 1

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

GaAlAs - Laser diodo de arseneto de gálio e alumínio

IL- 5 - Interleucina 5

IL-1 - Interleucina 1

IL-17 - Interleucina 17

IL-6 - Interleucina 6

J - Joules

Kg - Quilogramas

KS300 - Câmera para captura de imagens Karl-Zeiss

LED - Diodo emissor de luz

LLLT - Low Level Laser Therapy

LPS - Lipopolissacarídeo

mg - Miligramas

MV - Mésio-vestibular

mW - Milliwatts

NADH - Nicotinamida adenina dinucleótido

nm – Nanômetros

PBS - Do inglês “Phosphated buffered solution”, traduzido como solução salina fosfatada

RANK - Fator de ativação do receptor de ativação nuclear kappa B

RANKL - Ligante do fator de ativação do receptor de ativação nuclear kappa B

T CD4+ - Linfócito T auxiliar

Th - Linfócitos T helper

Th17 - Linfócitos T helper 17

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

UNIUBE - Universidade de Uberaba

λ - Lambda

μm - Micrômetro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mediana, mínimo e máximo da densidade de colágeno em porcentagem de área de colágeno e reabsorção óssea na raiz méso-vestibular do primeiro molar de ratos Wistar.	29
---	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
HIPÓTESE	19
OBJETIVOS.....	20
Objetivo geral.....	20
Objetivo específico	20
MATERIAL E MÉTODOS	21
Animais	21
Indução da periodontite.....	22
Grupos e desenho experimental	21
Tratamento com laser.....	23
Anestesia e remoção do material a ser analisado.....	23
Desmineralização e processamento histológico.....	24
Quantificação do osso alveolar absorvido	26
Quantificação de mastócitos	26
Quantificação de leucócitos	27
Quantificação de colágeno	27
Quantificação de células marcadas com anticorpos anti-IL-17	27
Análise estatística.....	25
Normas para elaboração do texto.....	25
RESULTADOS	29
Análise histológica de colágeno.....	29
Análise da reabsorção óssea.....	29
Análise histológica de leucócitos.....	30
Análise histológica de mastócitos	30
Análise histológica de células marcadas por anticorpo anti-IL-17	32
DISCUSSÃO.....	33
CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXO A — PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	41

INTRODUÇÃO

As doenças periodontais são infecções crônicas que envolvem a destruição do aparelho de suporte de dente, incluindo a gengiva, o ligamento periodontal e osso alveolar. Estas doenças são iniciadas por um acúmulo local de bactérias adjacentes ao dente. As doenças periodontais, incluindo gengivite e periodontite, podem afetar um ou mais dentes, e se não forem tratadas, podem levar à perda do dente. É a condição dental mais comum em adultos, e são também as doenças inflamatórias crônicas que mais afetam a maioria da população por todo o mundo. Embora o biofilme seja essencial para a início das doenças periodontais, a maioria dos processos destrutivos associados com estas doenças se devem a uma resposta excessiva do hospedeiro ao desafio bacteriano. Portanto, as doenças periodontais são multifatoriais e complexas (NOVAK, 2002).

As doenças periodontais podem ser classificadas em duas categorias gerais denominadas gengivite e periodontite, com base na ocorrência ou não de perda óssea. A gengivite é considerada uma forma reversível da doença, e, geralmente, envolve a inflamação dos tecidos gengivais sem perda de inserção de tecido conjuntivo e nem perda óssea (MARIOTTI, 1999). A periodontite é definida como a presença de inflamação gengival em locais onde houve um descolamento patológico das fibras colágenas do cimento, o epitélio juncional tenha migrado apicalmente, e perda óssea pode ser detectada por exame radiográfico. Os eventos inflamatórios associados a perda de inserção de tecido conjuntivo levam a reabsorção de porções coronais do osso alveolar de suporte do dente (VAN DYKE, 2008).

O periodonto (peri = em torno do, odontos = dente) compreende a gengiva, o ligamento periodontal, o cimento, e o osso alveolar (Figura 1). A principal função do periodonto consiste em ligar o dente ao tecido ósseo das maxilas e manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade oral (LINDHE, 2005).

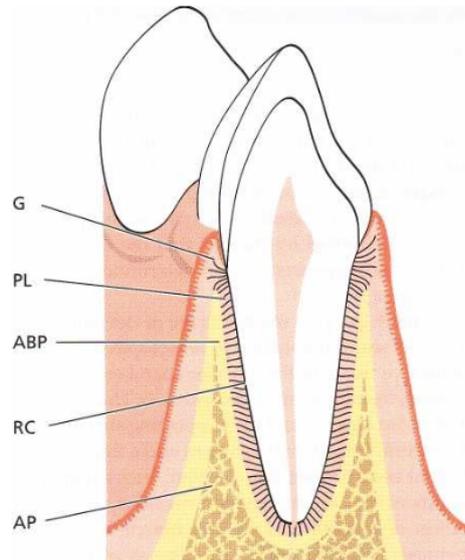


Figura 1 - Esquema ilustrativo dos componentes do periodonto:

a gengiva (G), o ligamento periodontal (PL), o cimento (RC), o osso alveolar (AP) e osso alveolar propriamente dito (ABP) (Lindhe, J., 2010).

Da saúde à doença, mudanças de composição ocorrem a partir de células bacterianas gram-positivas, organismos não móveis e cocos, para gram-negativas, organismos móveis e espiroquetas. Subprodutos bacterianos como lipopolissacarídeo (LPS), que é uma endotoxina bacteriana que induz efeitos inflamatórios e pró-coagulantes, induzem as células do sistema imunológico do hospedeiro, especialmente leucócitos e uma resposta inflamatória causando perda de tecido periodontal (OFFENBACHER, 1996). Análises moleculares da microbiota periodontal revelaram profundas mudanças na estrutura do biofilme associados à transição da saúde à doença (WADE, 2011).

As bactérias do complexo vermelho (SOCRANSKY, 1998), incluindo, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* demonstraram ter mais estreita associação com a severidade da periodontite. Além deste grupo, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermedia* (HAFFAJEE e SOCRANSKY, 2000) também estão associadas. No entanto, as pesquisas sugerem que a patogênese da periodontite envolve sinergia polimicrobiana e disbiose. A disbiose da microbiota periodontal significa uma alteração relativa dos componentes individuais da comunidade bacteriana em comparação com a sua abundância na saúde periodontal, levando a alterações na interação microrganismo e hospedeiro suficientes para iniciar a inflamação e perda óssea (Figura 2).

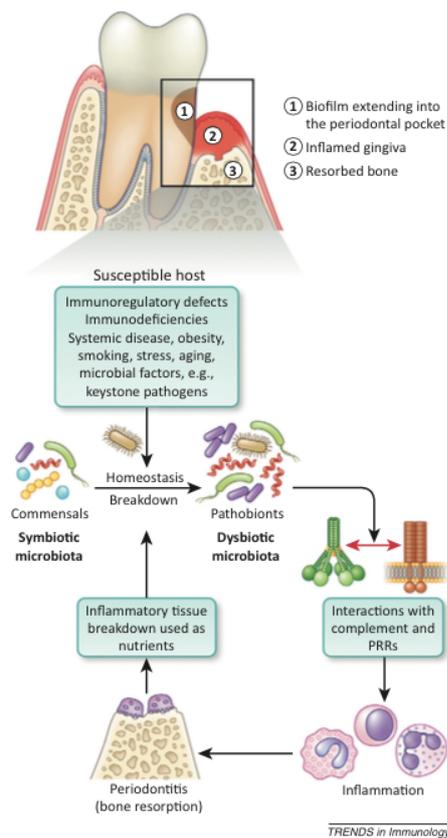


Figura 2 - Sinergia polimicrobiana e disbiose (estado alterado da ecologia microbiana na cavidade oral) em hospedeiros suscetíveis induz periodontite (HAJISHENGALLIS et al., 2014).

Pesquisas recentes têm produzido novos dados sobre os mecanismos biológicos que podem ser importantes na modulação dos processos patológicos envolvidos na periodontite, incluindo inflamação localizada persistente e perda óssea alveolar (HAJISHENGALLIS et al., 2014). Estas pesquisas sugerem que o *P. gingivalis*, pode modificar a resposta imune adaptativa. Especificamente, a interação de *P. gingivalis* com células dendríticas induz um padrão de citocinas que favorece a polarização de células T helper (Th) 17 (MOUTSOPOULOS, 2012).

Uma rede complexa de citocinas é sintetizada em resposta a estas bactérias periodontopatogênicas e desempenha um papel importante na doença periodontal (OPAL e DEPALO, 2000; SALVI e LANG, 2005). A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que estimula uma variedade de células para produzir mediadores inflamatórios tais como IL-1, IL-6 e TNF- α . Embora as vias de sinalização Th17 são principalmente associadas à proteção contra bactérias via recrutamento de fagócitos, eles também têm sido citadas no aumento de reabsorção óssea alveolar (SHAKER, 2012).

A interleucina (IL) -17 promove a granulopoiese e atua no recrutamento, ativação e a sobrevivência de neutrófilos (YE et al, 2001; VON VIETINGHOFF e LEY, 2008). O influxo de neutrófilos da circulação para os tecidos afetados é um elemento chave da resposta inflamatória à infecção ou lesão. O processo pelo qual os neutrófilos são recrutadas para os tecidos inflamados é complexo, envolvendo a sua adesão a células endoteliais, o rastreamento para detectar locais para transmigração, o extravasamento para dentro dos tecidos e a migração para o local da lesão (HAJISHENGALLIS et al., 2014).

O aumento na expressão da IL-17 promove osteoclastogênese e está associada com a perda óssea, e estes níveis elevados de IL-17 são encontrados no fluido crevicular de bolsas periodontais de pacientes com periodontite. Células Th17 um subconjunto de células T caracterizadas como produtoras de IL-17 foram recentemente identificadas em lesões crônicas periodontais. Dados indicam que a IL-17 é crucial na proteção contra patógenos extracelulares e pode desempenhar um papel duplo: melhorar o controle de patógenos e promover a reabsorção alveolar quando liberado em quantidades excessivas. A IL-17 exerce a sua atividade osteoclastogênica realçando a expressão de RANKL em osteoblastos e células LT CD4+. Além disso, a IL-17 contribui para a inflamação local, recrutamento e ativação de células imunes, o que conduz a uma abundância de citocinas inflamatórias, tais como IL-5 e TNF- α , e RANKL (VERNAL, 2005; CARDOSO, 2009; DI BENEDETTO et al., 2013).

Abordagens terapêuticas para a periodontite recaem em duas categorias principais: tratamento anti-infeccioso, que é concebido para impedir a progressão da perda de inserção periodontal por eliminação dos factores etiológicos; e tratamento regenerativo que destina-se a restaurar as estruturas destruídas pela doença. Essencial para ambas as abordagens de tratamento é a inclusão de procedimentos de terapia periodontal de suporte (RAMFJORD, 1993; COCHRAN et al., 2014).

A terapia anti-infecciosa inclui as abordagens quimioterápicas e mecânicas para minimizar ou eliminar o biofilme microbiano, que é a etiologia primária da gengivite e periodontite. Terapia mecânica consiste no desbridamento das raízes pelo uso meticuloso de raspadores de mão ou motorizados para remover o biofilme, endotoxinas presentes no cimento, cálculo e outros fatores locais retentivos. O termo terapia mecânica refere-se tanto a raspagem supra como subgingival, bem como o alisamento radicular. Em teoria, estes procedimentos são diferentes,

mas no ponto de vista da maioria dos clínicos, a diferença entre raspagem e alisamento radicular é realmente uma questão de grau de lisura da superfície (COBB, 1999).

Historicamente, as estratégias para a regeneração periodontal tem focado predominantemente em substitutos ósseos, na aplicação de barreiras de membrana para preenchimento de defeitos, e uso de biomodificadores de superfície associados a fatores de crescimento celular. Mais recentemente, um número grande de tecnologias evoluíram e podem ser vistas como as abordagens terapêuticas emergentes para a regeneração periodontal. A aplicação de terapia de proteína e peptídeo, a terapia celular, a terapia genética, a aplicação de arcações ósseos, anabólicos ósseos e lasers são consideradas tecnologias emergentes para a regeneração periodontal (COCHRAN et al., 2014).

A terapia laser de baixa intensidade (Low Level Laser Therapy - LLLT) foi introduzida como uma modalidade terapêutica, já em 1968. A LLLT demonstra ser eficaz no tratamento da micro-circulação comprometida, cicatrização de feridas, no alívio da dor, na consolidação da fraturas, e redução da inflamação e inchaço. A porção próxima ao infravermelho do espectro tem demonstrado ser altamente absorvida, ter efeitos terapêuticos e únicos em tecidos vivos e fornecer os melhores resultados. A LLLT reduziu a inflamação gengival e melhores resultados terapêuticos são alcançados quando ela foi aplicada durante a terapia periodontal tradicional (HOURELD et al., 2008; OBRADOVIC et al., 2009; AKYOL , 2011).

A LLLT tem sido testada em muitos estudos com animais para examinar a influência da radiação laser sobre o processo de cicatrização da ferida, no entanto, apenas recentemente, tem havido um interesse crescente no uso da LLLT na cicatrização gengival, nos vários procedimentos cirúrgicos periodontais. A LLLT usa a luz do laser de baixa potência na faixa de 1-1000 mW, em comprimentos de onda 632-1064 nm, para estimular uma resposta biológica. Estes lasers não emitem calor, som ou vibração. Em vez de gerar um efeito térmico, a LLLT atua induzindo uma reação fotoquímica na célula, um processo referido como bio-estimulação ou fotobiomodulação, portanto, os efeitos térmicos a este comprimento de onda são insignificantes. A LLLT demonstra não só acelerar a cicatrização de feridas, atuando sobre as células inflamatórias, mas também melhorando a micro-circulação. Lasers também têm sido utilizados para reduzir a dor, resultando em um mínimo desconforto pós-operatório. O efeito terapêutico é produzido pela absorção destes comprimentos de onda em foto-receptores dentro dos componentes intracelulares, especialmente na cadeia de transporte de

elétrons dentro das membranas das mitocôndrias. Isto faz com que a ativação da cadeia respiratória, na oxidação de NADH, cause o aumento da oferta de ATP, resultando na estimulação das funções normais de células (KARU, 1986; SATO et al., 1994; HASHIMI et al., 2010).

Na literatura, há uma grande variedade de estudos *in vitro* e *in vivo*, tanto em modelo animal quanto humano, sobre os efeitos da LLLT nos mecanismos de reparo ósseo. Dentre as reações teciduais biomoduladas pela irradiação a laser, citam-se um aumento da proliferação celular, aumento da atividade dos osteoblastos, da vascularização e da formação óssea, maior deposição de colágeno, além de propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, acelerando o início do processo cicatricial (LUGER, 1998; WEBER et al., 2006; PINHEIRO e GERBI, 2006; CERQUEIRA et al., 2007; LIU et al., 2007; FREEDO et al., 2009).

Muitos destes estudos utilizaram o laser diodo de arseneto de gálio e alumínio, GaAlAs, com resultados efetivos em várias situações que envolvem reparo ósseo. Seus efeitos biomoduladores positivos foram demonstrados em áreas de fraturas (LIU et al., 2007; SHAKOURI et al., 2010), em defeitos ósseos *in vitro* (GUZZARDELLA et al., 2002), defeitos ósseos *in vivo*, (SILVA JÚNIOR et al., 2002; AKYOL e GÜNGÖRMÜS, 2010), defeitos periodontais (ABOELSAAD et al., 2009), em áreas de enxerto (GERBI et al., 2005; WEBER et al., 2006), áreas de distração osteogênica (HÜBLER et al. 2010) e na osseointegração de implantes (CAMPANHA et al., 2010). O comprimento de onda infravermelho confere uma maior capacidade de penetração nos tecidos biológicos, permitindo alcançar e agir sobre o osso subjacente (SILVA JÚNIOR, et al., 2002; PINHEIRO e GERBI, 2006; CAMPANHA et al., 2010; SHAKOURI et al., 2010).

Baseado no exposto acima, o presente estudo se propõe a avaliar o efeito da fotobiomodulação na gengiva e mandíbulas de ratos wistar induzidos à periodontite.

HIPÓTESE

A hipótese alternativa deste trabalho foi que o tratamento com o laser no comprimento de onda de 660nm promova uma neo-formação óssea nas mandíbulas e melhore a resposta inflamatória nas gengivas de ratos Wistar induzidos à periodontite induzida por ligadura.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar o efeito da irradiação com luz laser 660nm em gengivas e mandíbulas de ratos Wistar induzidos a periodontite por ligadura.

Objetivo específico

Determinar o efeito da irradiação com luz laser 660nm, nos seguintes parâmetros:

- densidade de leucócitos nas gengivas;
- densidade de mastócitos nas gengivas;
- densidade de células marcadas por anticorpo anti-IL-17 nas gengivas;
- porcentagem de colágeno nas gengivas;
- reabsorção óssea ao redor da raiz méso vestibular do primeiro molar inferior.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

O estudo foi realizado com ratos machos adultos da linhagem Wistar, pesando entre 250g e 350g, provenientes do Biotério da Universidade de Uberaba (UNIUBE). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, com acesso livre à dieta composta por ração comercial para ratos da marca Labina e água ad libitum. A temperatura foi mantida em 22°C e luminosidade programada para ciclos claro/escuro com duração de 12 horas cada ciclo. Os experimentos seguiram as normas de manejo e experimentação em animais, preconizadas pelo Colégio Brasileiro Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba, conforme o Processo 027/2012.

Indução da periodontite

Os animais foram anestesiados utilizando Xilazina (relaxante muscular - Dopaser - Hertape Calier) na dose de 5 mg/kg e Ketamina (anestésico - Dopalen - Ceva) na dose de 95 mg/kg de massa corporal, administradas via intraperitoneal.

Sobre uma mesa de suporte, os animais já anestesiados foram preparados para colocação de um fio de linha número 10 de algodão, denominado “ligadura” (Figura 3) conforme descrito por CARVALHO et al (2011).



Figura 3 - Imobilização do animal anestesiado sobre a mesa suporte.

A ligadura foi colocada (imobilizada) em torno dos primeiros molares dos lados direito e esquerdo da mandíbula dos animais utilizando-se uma lima endodôntica número 40 (Figura 4) para abrir as ameias entre o primeiro e segundo molares e fixando-a com um nó, após a

colocação da ligadura. As ligaduras foram removidas após sete dias, período suficiente para a indução da doença periodontal experimental, de acordo com estudos prévios (CARVALHO et al, 2011).

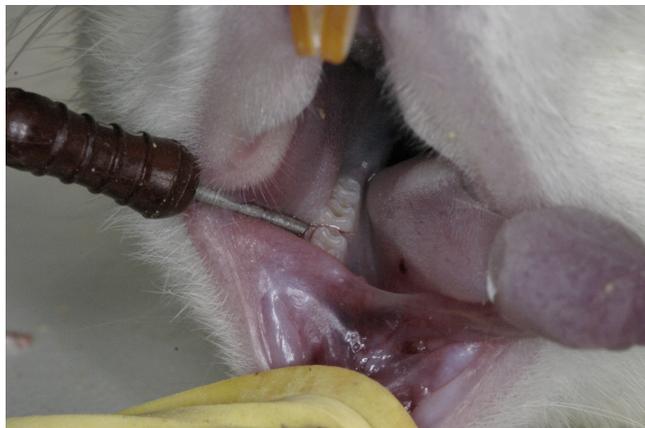


Figura 4 - Separação das ameias entre o primeiro e segundo molares utilizando uma lima endodôntica 40, abrindo espaço para a inserção da ligadura.

Grupos e desenho experimental

No experimento, foram utilizados 20 animais, divididos em quatro grupos, a saber:

- Grupo Evolução Natural: Formado por cinco animais que permaneceram com a ligadura por sete dias e, após a sua remoção, permaneceram em recuperação espontânea (sem laserterapia) por sete dias, sendo então eutanasiados.
- Grupo Eutanasia Imediata: Formado por cinco animais que permaneceram com a ligadura por sete dias e foram eutanasiados imediatamente após a remoção da ligadura.
- Grupo LLLT: Formado por cinco animais que permaneceram com a ligadura por sete dias e, após a sua remoção, receberam sessões diárias de laser (660 nm) por sete dias e foram eutanasiados um dia após a última sessão de laserterapia. As sessões de laser foram realizadas uma vez ao dia, sob anestesia geral, e fluência de $2,1 \text{ J/cm}^2$ no modo contínuo, aplicado de forma pontual ao redor da inserção gengival durante um minuto.
- Grupo Controle: Formado por cinco animais que foram eutanasiados sem terem recebido a ligadura ou tratamento com laser.

Tratamento com laser

Foi utilizado o equipamento LASERPULSE (IBRAMED, Brasil) acoplado a uma Caneta Laser 660nm (IBRAMED, Brasil), operando no modo contínuo. A fluência testada foi de 2,1 J/cm², utilizando uma potência de 36mW/cm², aplicada uma vez ao dia por um minuto de cada lado da mandíbula, durante sete dias, como relatado em dados da literatura (CARVALHO et al., 2011). A mensuração da fluência e potência foi feita através de um leitor LASER METER, modelo FIELDMATE (COHERENT, USA) e cabeça de detecção POWER MAX PM3 (COHERENT, USA).

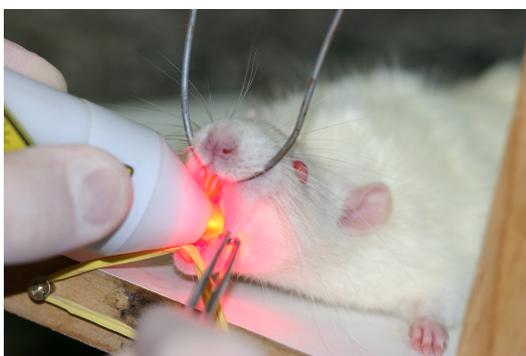


Figura 5 - Caneta laser operando em modo contínuo sobre a área dos dentes com as ligaduras.

Para serem submetidos à aplicação do laser, os animais foram previamente anestesiados e posicionados no suporte (Figura 5). A caneta emissora do laser foi posicionada a uma distância de 5 mm do primeiro molar inferior lado direito e esquerdo.

Anestesia e remoção do tecido a ser analisado

Para a eutanásia dos animais, foi aplicado Xilazina e Ketamina aprofundando a anestesia (4 vezes a dose anestésica usual) intraperitoneal. Os animais foram então decapitados com auxílio de guilhotina e a cabeça foi imersa em formol 10% tamponado, onde permaneceu por um período de 24 horas, a fim de fixar os tecidos e evitar a sua maceração durante o manuseio para retirada da mandíbula e da gengiva. Após este período as mandíbulas foram retiradas, sem separar as metades.

Desmineralização e processamento histológico

As mandíbulas permaneceram por três dias no formol 10% tamponado, tendo sido então lavadas em água corrente por um período de no mínimo 12 horas, para posteriormente serem imersas em solução desmineralizadora (EDTA 10%), cuja troca foi realizada de três em três dias, testando em cada troca o grau de maciez da peça, por meio de incisão feita com bisturi nos dentes incisivos de cada peça. O procedimento foi repetido até que os incisivos pudessem ser cortados com facilidade (consistência semelhante a tecidos moles), indicando uma adequada descalcificação por aproximadamente três meses. Nesse momento, as peças de mandíbulas foram divididas em metades direita e esquerda, o incisivo foi removido e o fragmento com os três dentes molares seguiu para o processamento histológico de rotina. Durante todo o experimento as peças foram devidamente identificadas com o grupo ao qual pertenciam, o número do animal e o lado.

As gengivas dos lados vestibular e lingual da região em torno do primeiro molar inferior foram retiradas e fixadas novamente em formol 10% tamponado (Figura 6), seguindo então para o processamento histológico de rotina.



Figura 6 - Mandíbula já dissecada sem separar as metades direita e esquerda e eppendorf contendo formol tamponado a 10% e fragmentos retirados das gengivas da área dos primeiros molares inferiores dos animais.

Fixação: Os tecidos retirados para análise histopatológica foram fixados em formaldeído. Desidratação: para retirada da água dos tecidos, a fim de permitir a impregnação da peça com parafina, a peça foi submetida em banhos sucessivos de etanol de teor crescente (70% - 100%).

Diafanização: para impregnar a peça foi utilizado o xilol nas seguintes etapas: o tecido foi submetido a álcool/xilol na concentração 1:1, por 30 minutos, após foram realizados banhos sucessivos de xilol: Xilol I - 25 minutos; Xilol II - 25 minutos; Xilol III - 25 minutos.

Impregnação pela parafina: as peças foram submetidas a banhos de parafina a 60°C no interior da estufa por duas horas.

Inclusão: peças que estavam na estufa foram transferidas para a forma com parafina fundida obtendo-se o bloco de parafina.

Microtomia: foram realizados cortes seriados de 6µm de espessura no bloco de parafina com o auxílio de um micrótomo.

Extensão: os cortes foram esticados em banho de água 50°C e pescados com a lâmina para a retirada das rugas provenientes dos cortes. Levou-se a lâmina à platina aquecedora a 40°C, por cinquenta minutos para a fixação do corte à lâmina. Para os cortes destinados à imunohistoquímica, estas lâminas foram previamente silanizadas.

Coloração: eliminou-se a parafina com banhos sucessivos de xilol, hidrataram-se os cortes com etanol de teor decrescente até a água, por 5 minutos cada. Procedeu-se a coloração com hematoxilina por 50 segundos, lavou-se em água corrente por aproximadamente 5 minutos, corou-se com eosina por 50 segundos, desidratou-se em três banhos de álcool absoluto por 5 minutos cada e após três banhos de xilol.

Imunohistoquímica: eliminou-se a parafina com banhos sucessivos de xilol, hidrataram-se os cortes com etanol de teor decrescente até a água, por 5-10 minutos cada. Em seguida as lâminas foram tratadas com ácido cítrico pH 6 (duas vezes cinco minutos). Após 20 minutos as lâminas foram lavadas com água deionizada e incubadas com solução de H₂O₂ 1% em metanol durante cinco minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas duas vezes com tampão

PBS por cinco minutos e incubadas com soro de bloqueio por uma hora em câmara úmida, de acordo com as instruções do fabricante do anticorpo. Em seguida as lâminas foram tratadas com o anticorpo primário por doze horas, lavadas três vezes com tampão PBS por cinco minutos em câmara úmida na geladeira. Finalmente os cortes foram tratados com anticorpo secundário durante 30 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida, lavados três vezes com PBS e incubados com substrato de peroxidase de acordo com as instruções do fabricante. Quando se observou coloração nos cortes as lâminas foram lavadas com água deionizada, contra-coradas com hematoxilina, desidratadas com etanol (quatro banhos de 10 segundos) e xilol (três banhos de 10 segundos).

Montagem da lâmina: ao final da preparação, tanto as lâminas coradas pelo HE quanto as de imunohistoquímica foram coladas às lamínulas com Entelan. Após a montagem, as lâminas secam em temperatura ambiente para posterior análise histopatológica.

Foi utilizada após a confecção de cada lâmina uma máscara em sua devida identificação, a fim de se impossibilitar o reconhecimento dos grupos controle e experimentais, impedindo dessa forma uma leitura subjetiva dos resultados e influenciar a leitura final, uma vez que, os grupos eram identificados.

Quantificação do osso alveolar absorvido

Nos cortes de mandíbula, identificou-se em qual corte o cimento começava a aparecer na raiz méso-vestibular (MV) dos primeiros molares (direito e esquerdo) utilizando um microscópio e a objetiva de 10X. A partir deste corte inicial, os outros cortes sequenciais foram analisados até que até a raiz MV estivesse completamente circundada por osso. Nesse momento foi realizada diferença entre o corte final e o corte inicial de cada uma das hemi-mandíbulas de todos os animais utilizados. O resultado foi usado na análise estatística.

Quantificação de mastócitos

Para a quantificação dos mastócitos utilizou-se as lâminas coradas pela Fucsina ácida com azul de toluidina 0,5% e um microscópio de luz comum, com objetiva de 100X. Para a obtenção da área avaliada, com o auxílio uma lâmina micrometrada, calculamos a área de cada campo. Depois foram feitas as contagens de mastócitos por campo, considerando apenas

os mastócitos que estavam no tecido conjuntivo e não aqueles que estavam no epitélio. Com o número de mastócitos e a área, calculou-se a densidade de mastócitos, sendo expressa em número de mastócitos por cm^2 .

Quantificação de leucócitos

Para a quantificação dos leucócitos utilizamos as lâminas coradas pela eosina e hematoxilina e um microscópio de luz comum, com objetiva de 100X. Realizou-se a contagem dos leucócitos em todos os campos dos cortes. Para a obtenção da área avaliada, com o auxílio de uma lâmina micrometrada calculamos a área de cada campo. Com o número de leucócitos, calculou-se a densidade de leucócitos, sendo expressa em número de leucócitos por cm^2 .

Quantificação de colágeno

A quantificação morfológica de colágeno tipo II e III, foi realizada em lâminas coradas com Picrosirius, e com a utilização de uma lente para luz polarizada, foi feita a quantificação da fibrose observada pelo programa Axio-Vision 4 (Carl Zeiss, Alemanha). Na coloração vermelho Picrosirius utilizada para analisar as fibras de colágeno examinadas sob a luz polarizada, as maiores aparecem fortemente birrefringentes em laranja ou de cor vermelha, enquanto que as fibras colágenas finas são fracamente bi-refringentes e aparecem de cor esverdeada. Esta birrefringência é altamente específica para colágeno. O sistema de análise de imagens utilizado foi com um microscópio com câmera para captura de imagens e um computador no aumento de 63 vezes. A densidade de colágeno, com auxílio da lente de luz polarizada, aparece ao microscópio nas cores amarela, laranja e verde. Assim marcamos esses feixes de fibras em cada campo observado na lâmina, através do programa. Desta forma o próprio programa nos deu os valores a serem avaliados na análise estatística.

Quantificação de células marcadas com anticorpos anti-IL-17

Para a quantificação de células marcadas com anticorpos anti-IL-17 utilizamos as lâminas coradas por imunohistoquímica e um microscópio de luz comum, com objetiva de 100X. Realizou-se a contagem das células marcadas com anticorpos anti-IL-17 em todos os campos dos cortes. Para a obtenção da área avaliada, com o auxílio de uma lâmina micrometrada

calculamos a área de cada campo. Com o número das células marcadas, calculou-se a densidade destas, sendo expressa em número de células por cm^2 .

Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.0. Os resultados foram primeiramente dispostos em uma planilha eletrônica e em seguida procedeu-se a análise estatística. Inicialmente em todas as variáveis foram testadas a distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a variância pelo teste de Barlett's (homogeneidade). Como todos os resultados não passaram no teste de normalidade e/ou homogeneidade, utilizou-se análise de variância não paramétrica a partir do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn e os resultados foram expressos em mediana, mínima e máximo.

Normas para elaboração do texto

Foi utilizada a NBR 14724/2011 - Informação e documentação — Trabalhos acadêmicos — Apresentação.

RESULTADOS

Análise histológica de colágeno

O grupo eutanasiado ao final do período de indução de periodontite apresentou níveis de colágeno ligeiramente inferiores aos dos grupos LLLT e controle, ligeiramente superiores aos do grupo evolução natural, embora sem diferença estatística significativa (Tabela 1). No entanto o animal que, após a indução da periodontite permaneceu em evolução natural durante sete dias (sem laserterapia) não retorna aos níveis de colágeno de um animal que não sofreu ligadura (controle), enquanto o grupo que recebeu laserterapia durante os sete dias (grupo LLLT) sim (Tabela 1).

Tabela 1 - Mediana, mínimo e máximo da densidade de colágeno em porcentagem de área de colágeno e reabsorção óssea na raiz méso-vestibular do primeiro molar de ratos Wistar.

Grupo	n	Colágeno		n	Reabsorção Óssea	
		Mediana	(Min/Max)		Mediana	(Min/Max)
Evol. Natural	50	4.4 ^{ab}	(0.25/13)	10	40 ^{ab}	(30/40)
Eutan. Imed.	74	6.5	(0.19/39)	10	70 ^{acd}	(60/70)
LLLT	84	7.8 ^a	(0.10/31)	8	40 ^{cc}	(20/50)
Controle	67	7.2 ^b	(0.04/33)	10	10 ^{bde}	(1/20)

Grupo Evolução Natural: Ligadura por sete dias e, após a sua remoção, permaneceram em recuperação espontânea (sem laserterapia) por sete dias, sendo então eutanasiados.

Grupo Eutanasia Imediata: Ligadura por sete dias e foram eutanasiados imediatamente após a remoção da ligadura.

Grupo LLLT: Ligadura por sete dias e, após a sua remoção, receberam sessões diárias de laser por sete dias e foram eutanasiados um dia após a última sessão de laserterapia.

Grupo Controle: Eutanasiados sem ter recebido a ligadura ou tratamento com laser.

Letras iguais, na mesma linha, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn.

Análise da reabsorção óssea

Ao avaliarmos o corte no qual a raiz méso-vestibular estava totalmente circundada pelo osso alveolar, no grupo eutanasiado logo após o período de indução da periodontite (grupo eutanasia imediata) foi observado uma reabsorção óssea em torno da raiz méso-vestibular significativamente maior do que nos grupos evolução natural ($p=0,0148$), LLLT ($p=0,0499$) e controle ($p < 0.0001$) (Tabela 1). O grupo que foi eutanasiado após 7 dias de evolução natural da periodontite apresentou reabsorção óssea numa profundidade semelhante ao do grupo

tratado com a laserterapia ($p > 0.9999$). Observa-se que no animal sem indução de periodontite praticamente não se observa reabsorção óssea em profundidade (Tabela 1).

Análise histológica de leucócitos

A Figura 7 mostra a densidade de leucócitos nos grupos estudados. Observa-se que o grupo LLLT obteve uma densidade significativamente maior que os grupos evolução natural, eutanásia imediata e controle ($p < 0.0001$, nas três comparações). Observa-se também que o grupo eutanasiado logo após a indução da periodontite apresentou densidade de leucócitos menor que o grupo de evolução natural, porém sem diferença estatística ($p > 0.9999$). Não há diferença entre o grupo de evolução natural e o grupo controle ($p > 0.9999$).

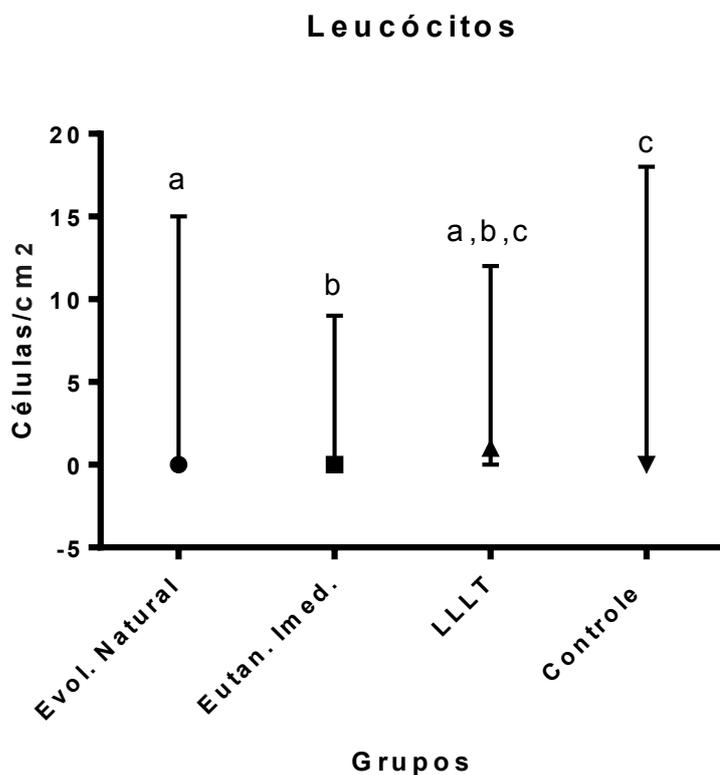


Figura 7- Densidade de leucócitos/cm², analisada após sete dias com ligadura e diferentes tratamentos.

Grupo Evolução Natural: Ligadura por sete dias e, após a sua remoção, permaneceram em recuperação espontânea (sem laserterapia) por sete dias, sendo então eutanasiados. Grupo Eutanasia Imediata: Ligadura por sete dias e foram eutanasiados imediatamente após a remoção da ligadura. Grupo LLLT: Ligadura por sete dias e, após a sua remoção, receberam sessões diárias de laser por sete dias e foram eutanasiados um dia após a última sessão de laserterapia. Grupo Controle: Eutanasiados sem ter recebido a ligadura ou tratamento com laser. Letras iguais, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn.

Análise histológica de mastócitos

A Figura 8 mostra a densidade de mastócitos nos grupos estudados. Observa-se que o grupo LLLT obteve uma densidade significativamente maior que os grupos evolução natural ($p < 0.0001$), eutanásia imediata ($p < 0.0001$) e controle ($p = 0,0491$). Observa-se também que o grupo eutanasiado logo após a indução da periodontite apresentou densidade de mastócitos significativamente maior que o grupo de evolução natural ($p = 0,0001$) e significativamente menor que o grupo controle ($p = 0,0388$). O grupo de evolução natural apresentou densidade de mastócitos significativamente menor que o grupo controle ($p < 0.0001$).

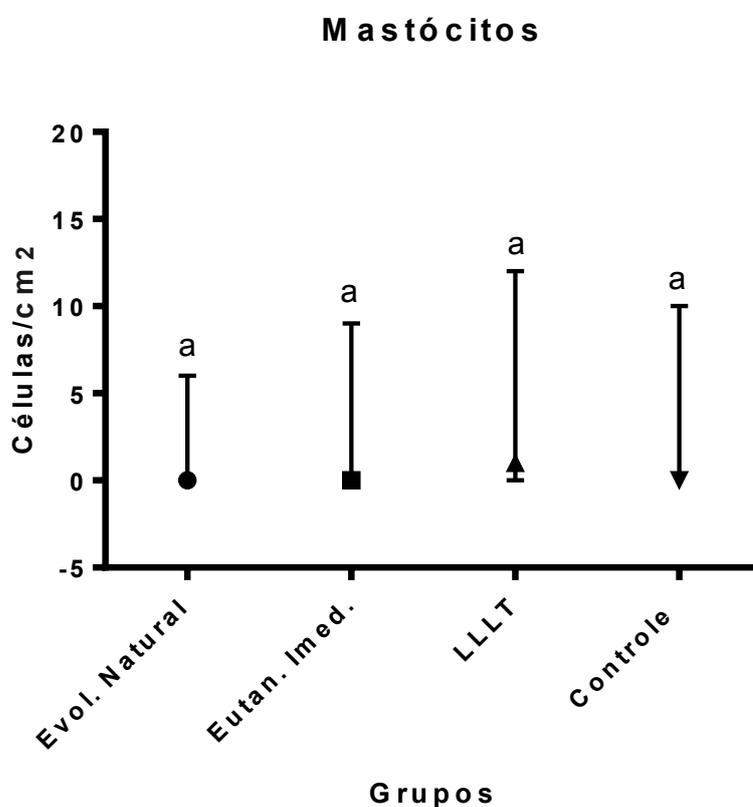


Figura 8 - Densidade de mastócitos/cm², analisada após sete dias com ligadura e diferentes tratamentos.

Grupo Evolução Natural: Ligadura por sete dias e, após a sua remoção, permaneceram em recuperação espontânea (sem laserterapia) por sete dias, sendo então eutanasiados. Grupo Eutanásia Imediata: Ligadura por sete dias e foram eutanasiados imediatamente após a remoção da ligadura. Grupo LLLT: Ligadura por sete dias e, após a sua remoção, receberam sessões diárias de laser por sete dias e foram eutanasiados um dia após a última sessão de laserterapia. Grupo Controle: Eutanasiados sem ter recebido a ligadura ou tratamento com laser. Letras iguais, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn.

Análise histológica de células marcadas por anticorpo anti-IL-17

A Figura 9 mostra a contagem de células marcadas com anticorpo anti IL-17 nos grupos estudados. Observa-se que o grupo LLLT obteve uma marcação para IL-17 significativamente maior que os grupos evolução natural, eutanásia imediata e controle ($p < 0.0001$, $p = 0,0079$ e $p = 0,0019$, respectivamente). Observa-se também que o grupo eutanasiado logo após a indução da periodontite apresentou nível de marcação para IL-17 significativamente maior que o grupo de evolução natural ($p = 0,0259$). Não há diferença entre o grupo de evolução natural e o grupo controle ($p = 0,0884$).

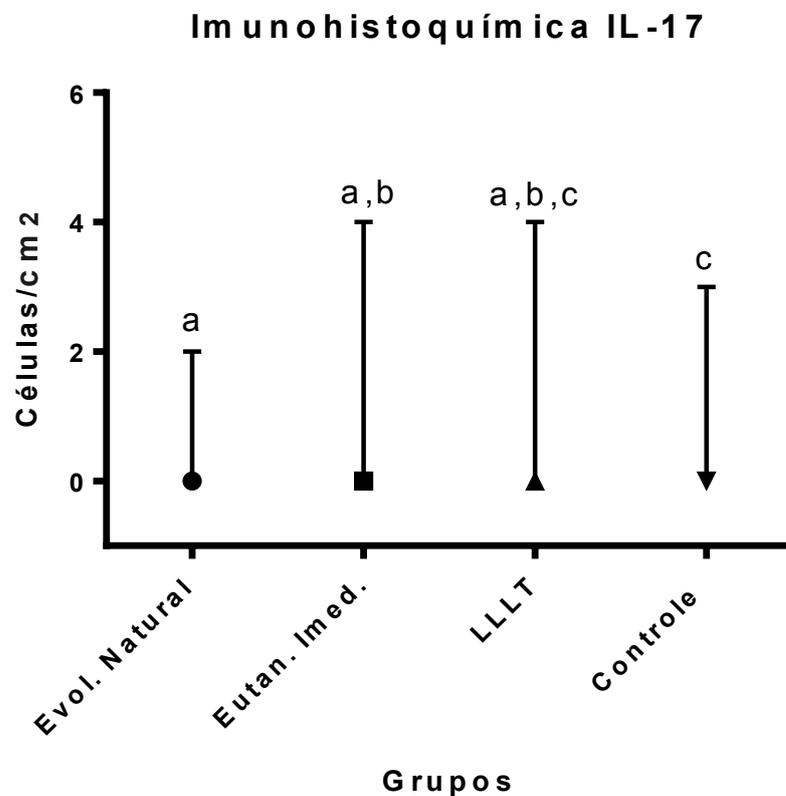


Figura 9 - Densidade de células marcadas por anticorpo anti-IL-17/cm², analisada após sete dias com ligadura e diferentes tratamentos após a retirada da ligadura:

Grupo Evolução Natural: Ligadura por sete dias e, após a sua remoção, permaneceram em recuperação espontânea (sem laserterapia) por sete dias, sendo então eutanasiados. Grupo Eutanásia Imediata: Ligadura por sete dias e foram eutanasiados imediatamente após a remoção da ligadura. Grupo LLLT: Ligadura por sete dias e, após a sua remoção, receberam sessões diárias de laser por sete dias e foram eutanasiados um dia após a última sessão de laserterapia. Grupo Controle: Eutanasiados sem ter recebido a ligadura ou tratamento com laser. Letras iguais, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn.

DISCUSSÃO

No tratamento de alguns casos de periodontite, não se consegue a resolução do tratamento através apenas de terapia mecânica. Dessa forma, alternativas para o emprego de terapias adjuntas ao tratamento periodontal não cirúrgico convencional como a LLLT, tem se mostrado relevantes (AYKOL, 2011).

Quando se analisa os inúmeros trabalhos sobre os efeitos da LLLT no processo de reparo ósseo, percebe-se que há grande dificuldade em se estabelecer comparações confiáveis de resultados entre os estudos. Tal fato decorre da grande variação de metodologias e protocolos usados, no que tange ao tipo de laser, densidade de energia, potência, modo de aplicação, início e duração das sessões (SILVA JÚNIOR et al., 2002; WEBER et al., 2006; FREDDO et al., 2009).

A maioria das explicações possíveis para o efeito da LLLT na resposta do tecido mole são baseados em processos foto-biológicos nos quais alvos foto-receptores nos tecidos, tais como porfirinas, flavo-proteínas endógenas e a enzima citocromo C-oxidase, conduzem ao aumento da função celular e uma cascata de eventos biológicos (SAFAVI, 2008).

Na presente pesquisa, a utilização da LLLT, com comprimento de onda de 660nm mostrou a recuperação dos níveis de colágeno para patamares semelhantes aos de um animal que não sofreu periodontite, enquanto o animal que não recebeu o tratamento não apresenta esta recuperação, sugerindo que a laserterapia induz a formação de colágeno. Resultados semelhantes foram observados na cicatrização de feridas do palato de ratos após irradiação com LED 660nm (WANG et. al., 2015) e na cicatrização de queimaduras de terceiro grau utilizando LLLT com 35mW/cm² e fluência de 3 J/cm², condições semelhantes as empregadas no nosso estudo (FIÓRIO et al., 2014). Este efeito indutor na síntese de colágeno provavelmente se deve ao aumento na expressão do gene COL 1 α 1, como observado por Martignago et al (2015), que observaram aumento da expressão deste gene após a irradiação de fibroblastos utilizando laser AlGaAs (904 nm, 2 J/cm²). A comparação do grupo eutanásia imediata com os grupos evolução natural e LLLT mostra que a não realização da LLLT no ápice do processo inflamatório pode levar a uma redução nos níveis de colágeno (observado

no grupo evolução natural), enquanto que a realização de LLLT tem a capacidade de retornar os níveis de colágeno aos patamares normais.

O efeito positivo da LLLT observado para expressão do colágeno não se repete para a neo-formação óssea, uma vez que os grupos evolução natural e LLLT apresentaram profundidades de reabsorção óssea similares. As ações biomoduladoras da LLLT no processo de reparo ósseo têm sido amplamente estudadas, com resultados animadores. Vários autores observaram efeitos positivos da LLLT em defeitos ósseos, em áreas de enxerto, fraturas, ou na osseointegração (LUGER et al., 1998; WEBER et al., 2006; LIU et al., 2007; CAMPANHA et al., 2010; SHAKOURI et al., 2010). Dados da literatura mostram que a mineralização óssea é afetada positivamente após tratamento com a LLLT (λ 660-690nm) de maneira tempo dependente (BARBOSA, 2013). Gomes et al (2015) observaram aumento na formação óssea peri-implantar após 13 dias de aplicação de laser GaAlAs (830nm, 50mW/cm², 10-20 J/cm²), sugerindo que a LLLT pode induzir a neo-formação óssea. Esses dados sugerem que o tempo necessário para obtenção de um efeito significativo na neo-formação óssea no nosso modelo experimental poderia ser maior que os 7 dias empregados no tratamento.

A LLLT induziu um aumento na resposta inflamatória medida pela densidade de leucócitos, sugerindo uma ação pró-inflamatória nas condições testadas, ao contrário do grupo que permaneceu sem tratamento. A revisão da literatura não mostra estudos que avaliem a densidade de leucócitos após LLLT associada a periodontite. Pallotta et al. (2012) mostraram que a LLLT reduziu o número de leucócitos e atividade mieloperoxidase em um modelo experimental de inflamação do joelho em ratos, utilizando luz infravermelha (810nm, 1, 3 e 6 J/cm²), em oposição portanto aos nossos resultados. Um estudo similar ao presente trabalho mostrou não haver diferença na migração de neutrófilos entre animais induzidos a periodontite por ligadura e tratado com luz e um grupo controle com ligadura, porém sem tratamento com LLLT (CARVALHO, 2011), sugerindo que a LLLT não possui este efeito redutor da inflamação no modelo da periodontite induzida por ligadura. Reforçando esta hipótese e corroborando os resultados do presente estudo, Albertini et al. (2004) relatam que a LLLT com laser GaAlAs (650nm, 1 J/cm²) possui ação pró-inflamatória em um modelo experimental de edema em pata de rato. Poderia ser esperado uma contagem superior de leucócitos no grupo II, que representa os animais eutanasiados ao final do período de indução da periodontite, fato que não se confirmou (Figura 7). Esse fato pode ser explicado pela diluição promovida pelo edema e também no prazo de sete dias com a ligadura, o processo

inflamatório pode ter passado da fase aguda para a fase crônica explicando assim uma contagem de leucócitos semelhante ao observado no grupo controle.

No que diz respeito a contagem de mastócitos os resultados sugerem que a LLLT promove um significativo aumento na densidade destas células em relação aos demais grupos (Figura 8), sugerindo o potencial da LLLT no recrutamento deste tipo celular. Da mesma maneira que o observado para leucócitos a contagem de células do grupo eutanásia imediata foi menor do que observado no grupo controle, sugerindo a presença de um edema ou cronificação do processo inflamatório. O grupo que evoluiu sem a aplicação da LLLT também apresentou densidade de mastócito inferior a observada no grupo controle, fato que pode ser explicado pela ocorrência de intensa degranulação destas células no tecido inflamado, dificultando sua identificação e contagem pela metodologia utilizada. Resultados similares foram descritos por Shiromany et al. (2014) que observaram que a quantidade de mastócitos degranulados foi maior na área fibrosa de cistos do que na zona inflamatória. Dessa forma, a maior quantidade de mastócitos degranulados presentes no grupo evolução natural dificultaria a sua contagem pela metodologia utilizada, explicando a menor densidade dessas células observada em nossos resultados. A LLLT mediada pelo laser Ga-Al-As tem ação anti-inflamatória dose dependente e é eficaz para certas vias inflamatórias e pode não apresentar eficácia em outras vias inflamatórias uma vez que foi demonstrado por Albertini et al. (2004) que a LLLT reduz a inflamação induzida por carragenina nas doses de 1 J/cm^2 e $2,5 \text{ J/cm}^2$, mas não na dose de 5 J/cm^2 e na inflamação induzida pelo composto 48/80 que promove a liberação de histamina, e em pesquisas bioquímicas, é usado para promover a degranulação dos mastócitos.

Corroborando os resultados acima, observamos aumento na densidade de células marcadas por anticorpos anti- IL-17 no grupo tratado com LLLT, em comparação com o grupo de evolução natural e o grupo onde se promoveu o eutanásia ao final do período de indução da periodontite. O aumento na expressão da IL-17 promove osteoclastogênese e está associada com a perda óssea. A IL-17 exerce a sua atividade osteoclastogênica realçando a expressão de RANKL em osteoblastos e células T CD4+ (VERNAL, 2005; CARDOSO, 2009; DI BENEDETTO et al., 2013), o que pode explicar a ineficácia da LLLT para promover reparação óssea nos sítios tratados após a indução da periodontite por ligadura (Tabela 1).

CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados podemos concluir que a LLLT com laser de 660nm e 2,1 J/cm² teve um efeito pró-inflamatório uma vez que induziu aumento nas densidades de leucócitos, mastócitos e células marcadas por anticorpo anti-IL-17 nas gengivas de ratos Wistar induzidos a periodontite nos levando a aceitar parcialmente a hipótese.

Além disso, a LLLT nas condições testadas tem o potencial de induzir a produção de colágeno nos levando a aceitar parcialmente a hipótese proposta.

Finalmente, a LLLT nas condições testadas não tem o potencial para induzir reparação óssea, provavelmente pela a indução da expressão de IL-17 um antagonista deste processo, nos levando a rejeitar parcialmente a hipótese proposta.

REFERÊNCIAS

- ABOELSAAD, N. S. et al. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study). **Lasers Med Sci**, v.24, p.387-395, 2009.
- AKYOL, U. K.; GÜNGÖRMÜS, M. Effect of biostimulation on healing of bone defects in diabetic rats. **Photomed Laser Surg**, v.28, n.3, p.411-416, 2010.
- ALBERTINI, R., AIMBIRE, F.S.C., CORREA, F.I. et al. Effects of different protocol doses of low powers GaAlAs laser radiation (650nm) on carragenan induced rat paw oedema. **J.Photochem. Photobiol. B. Biology** 74, 101-107, 2004.
- AYKOL, G.; BASER, U.; MADEN, I. et al. The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. **J. Periodontol.**, v. 82, n. 3, p. 481–488, 2011
- BARBOSA, D. et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on bone repair in rats: optical densitometry analysis. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 651–656, 6 jun. 2012.
- CAMPANHA, B. P. et al. Low-level laser therapy for implants without initial stability. **Photomed Laser Surg**, v.28, n.3, p.365-369, 2010.
- CARDOSO; C. R., GARLET; G. P., CRIPPA; G. E. et al. Evidence of the presence of T helper type à cells in chronic lesions of human periodontal disease, **Oral Microbiology and Immunology**, v.24, n. 1, p. 1-6, 2009.
- CARVALHO, A.L.; NAPIMOGA, M.H.; COELHO-CAMPOS, J.; SILVA-FILHO, V.J.; THEDEI, G. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. **Photomed Laser Surg.**, v. 29, n. 11, p.735-40, 2011.
- CERQUEIRA, A. et al. Bone tissue microscopic findings related to the use of diode laser (830 nm) in ovine mandible submitted to distraction osteogenesis. **Acta Cir Bras**, v.22, n.2, p.92-97, 2007.
- COBB, CM. Oral biofilms in health and disease. *In*: New-man HN, Wilson M, ed. **The mechanical control of sub-gingival plaque. Dental plaque revisited**. London: East- man Dental Institute, University College, p.457-502, 1999.
- COCHRAN, D.L.; COBB, C.M.; BASHUTSKI, J.D.; CHUN, Y.H.; LIN, Z.; MANDELARIS, G.; McALLISTER, B.S.; MURAKAMI. S.; RIOS, H.F. Emerging regenerative approaches for periodontal reconstruction: **A Consensus Report. J Periodontol.**, v.15, p.1-5, 2014.
- DI BENEDETTO, A. et al. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, n. 3, p. 1-7, 2013.
- FIÓRIO, F. B. et al. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 1, p. 313-319, 2013.
- FREDDO, A. L. et al. Effect of low-level laser therapy after implantation of poly-L-lactic/polyglycolic acid in the femurs of rats. **Lasers Med Sci**, v.24, p.721-728, 2009.
- GERBI, M. E. M et al. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830 nm. **Photomed Laser Surg**, v.23, n.4, p.382-388, 2005.

- GOMES, F. V. et al. Low-level laser therapy improves peri-implant bone formation: resonance frequency, electron microscopy, and stereology findings in a rabbit model. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 2, p. 245-251, 1 fev. 2015.
- GUZZARDELLA, G. A. et al. Laser stimulation on bone defect healing: an in vitro study. **Lasers Med Sci**, v.17, p.216-220, 2002.
- HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontology 2000**; v. 5, p. 78-111, 1994.
- HAJISHENGALLIS, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 1, p. 3–11, 1 jan. 2014.
- HAJISHENGALLIS, G.; SAHINGUR, S. E. Novel inflammatory pathways in periodontitis. **Advances in Dental Research**, v. 26, n. 1, p. 23–29, 2014.
- HOURELD, N.N.; ABRAHAMSE, H. Laser light influences cellular viability and proliferation in diabetic-wounded fibroblast cells in a dose- and wavelength-dependent manner. **Lasers Med Sci**, v.23, p.11-18, 2008.
- HÜBLER, R. et al. Effects of low-level laser therapy on bone formed after distraction osteogenesis. **Lasers Med Sci**, v.25, p.213-219, 2010.
- KARU, T.I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser irradiation. **Dokl Akad Nauk SSSR**, v. 291, p. 1245-1249, 1986.
- LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol.**, v.7, p.678-689, 2007.
- LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- LIU, X. et al. Effect of lower-level laser therapy on rabbit tibial fracture. **Photomed Laser Surg**, v.25, n.6, p.487-494, 2007.
- LUGER, E. J. Effect of low-power irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Laser Surg Med**, v.22, n.2, p.97-102, 1998.
- MARIOTTI, A. Dental plaque-induced gingival diseases. **Ann Periodontol**, v.4, p.7-19, 1999.
- MARTIGNAGO, C. C. S. et al. Effect of low-level laser therapy on the gene expression of collagen and vascular endothelial growth factor in a culture of fibroblast cells in mice. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 1, p. 203–208, 30 ago. 2014.
- MOUTSOPOULOS, N.M. et al. Porphyromonas gingivalis promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. **J. Autoimmun.**, v.39, p.294-303, 2012.
- NOVAK, M.J. Classification of diseases and conditions affecting the periodontium. *In*: NEWMAN, M.G.; TAKEI, H.H.; CARRANZA, F.A.(eds). **Carranza's clinical periodontology**, 9ed. WB Saunders Company, p.64-73, 2002.
- OBRADOVIĆ, R.; LJ, K.; PEŠEVSKA, S. Influence of low-level laser therapy on biomaterial osseointegration: a mini-review. **Lasers Med Sci**, v, 24, n.3, p.447-451, 2009.
- OFFENBACHER, S. Periodontal diseases: pathogenesis. **Ann. Periodontol.**, v.1, p,821-878, 1996.

- OPAL, S. M.; DEPALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines. **Chest**, v. 117, n 4, p. 1162-1172, 2000.
- PALLOTTA, R. C. et al. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 1, p. 71-78, 2011.
- PINHEIRO, A.L.B.; GERBI, M.E. Photoengineering of bone repair processes. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.2, p.169-178, 2006.
- RAMFJORD, S.P. Maintenance care and supportive periodontal therapy. **Quintessence Int.**, v.24, p.465-471, 1993.
- SAFAVI, S.M.; KAZEMI, B.; ESMAEILI, M.; FALLAH, A.; MODARRESI, A.; MIR, M. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the geneexpression of IL-1beta, TNF-alpha, IFN-gamma, TGF-beta,bFGF, and PDGF in rat's gingiva. **Lasers Med Sci.**, v. 23, n. 3, p. 331-335, 2008.
- SALVI, G. E.; LANG, N. P. Host response modulation in the management of periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 6, p. 108-129, 2005.
- SATO, T.; KAWATANI, M.; TAKESHIGE, C.; TAKESHIGE, C.; MATSUMOTO, I. Ga-Al-As laser irradiation inhibits neuronal activity associated with inflammation. **Acupunct Electrother Res.**, v.19, p.141-51, 1994.
- SHAKER, O. G.; GHALLAB, N. A. IL-17 and IL-11 GCF Levels in Aggressive and Chronic Periodontitis Patients: Relation to PCR Bacterial Detection. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, n. 1, p. 1-7, 2012.
- SHAKOURI, S. K. et al. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. **Lasers Med Sci**, v.25, p.73-77, 2010.
- SHIROMANY, A. Comparison of Mast Cells and Inflammatory Cells within Periapical Lesions and Comparison of Degranulated Mast Cells Between Fibrous and Inflamed Area in Radicular Cysts: An Immunohistochemical Study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 2014.
- SILVA JÚNIOR, A. N. et al. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **J Clin Laser Med Surg**, v.20, n.2, p.83-87, 2002.
- SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; M. CUGINI, A.; SMITH, C.; KENT Jr., R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 25, n. 2, p. 134-144, 1998.
- VERNAL, R.; DUTZAN, N.; CHAPARRO, A.; PUENTE, J.; VALENZUELA, M. A.; GAMONAL, J. Levels of interleukin-à in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32,n.4, p. 383-389, 2005.
- VON VIETINGHOFF, S.; LEY, K. Homeostatic regulation of blood neutro- phil counts. **J Immunol.**, v. 181, p.5183-5188, 2008.
- WADE, W.G. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? **J. Clin. Periodontol.**, v.38 (Suppl. 11), p.7-16, 2011.
- WANG, C.Y.; TSAI, S.C.; YU, M.C.; LIN, Y.F.; CHEN, C.C.; CHANG, P.C. 660 nm LED Light Irradiation Promotes the Healing of the Donor Wound of Free Gingival Graft. **J Periodontol.**, v.29, p.1-17, 2015.

WEBER, J.B.B. et al. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologus bone graft. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.1, p.38-44, 2006.

YE, P.; RODRIGUEZ, F.H.; KANALY, S.; STOCKING, K.L.; SCHURR, J.; SCHWARZENBERGER, P. et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. **J Exp Med** 194:519-527, 2001.

ANEXO A — PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-066/2012

Uberaba, 05 de outubro de 2012

Ilmo. Prof.

Geraldo Thedei Júnior

Assunto: Encaminha processo nº 027/2012, sobre o protocolo de Pesquisa "Efeito da fotobiomodulação na periodontite induzida em ratos".

Prezado(a) Professor(a),

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido à avaliação do CEEA-UNIUBE na reunião do dia 05/10/2012, sendo considerado **aprovado**.

Atenciosamente,

Prof. Joly F. Figueiredo Bittar

Coordenadora do CEEA-UNIUBE