

UNIVERSIDADE DE UBERABA

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA PERIODONTITE
INDUZIDA EM RATOS**

Uberaba – MG
2013

ALEXANDRE SANTOS CARVALHO

EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA PERIODONTITE INDUZIDA EM RATOS

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

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior

Uberaba - MG
2013

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado graças aos auxílios financeiros recebidos das seguintes instituições:

- Universidade de Uberaba: Processos da Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Extensão (PROPEPE) e do Programa de Apoio à Pesquisa (PAPE), que concedeu recursos financeiros para o Projeto de Pesquisa.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), que concedeu a bolsa de estudos para o aluno Alexandre Santos Carvalho.

Odontologia é uma profissão que requer daqueles que a exercem o senso estético de um artista, a destreza de um cirurgião, os conhecimentos científicos de um médico e a paciência de um monge. "

Papa Pio XII

DEDICATÓRIA

A Deus, que me ilumina... Ao Senhor Deus, a seu filho Jesus Cristo e ao Divino Espírito Santo, por tudo. Ao meu Deus, que me proporcionou mais esta vitória, na minha luta, o maior vencedor é o meu Mestre e Senhor, que me encorajou durante esses anos.

A todos que me ajudaram a finalizar mais esta etapa da minha vida, visto que este trabalho encerra a minha graduação e que nada disso seria possível sem o apoio de tantas pessoas, que sequer me atrevo a citar nomes, por medo de, por descuido, um ser esquecido, obrigada a todos que me ajudaram; essa vitória também é de vocês.

Dedico também às pessoas que sonham e acreditam na inclusão social como um caminho para uma sociedade mais justa e digna, àqueles que lutam por essa justiça, e a todas as pessoas com deficiência ou reabilitadas, que comungam desta luta.

AGRADECIMENTOS

Ao meu **orientador, Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior**, pela orientação firme e comprometida, pelo apoio, atenção e paciência dedicados a mim. Pela generosidade em dividir seus conhecimentos e, sobretudo, pelo privilégio de merecer a sua confiança durante toda a minha vida acadêmica. A você a minha admiração e gratidão.

Agradeço a **Deus** pelo seu amor que é a minha razão de viver.

Aos meus pais, **Vicente e Benedita (*in memoriam*)**, meus heróis. Nunca poderei expressar o meu amor como vocês sempre mereceram. Tudo foi feito para meu irmão e eu com o maior amor, da melhor forma possível durante toda a nossa vida. Só tenho que agradecer com todo o meu coração a vocês e a Deus por me dar esta família. Dedico todas as vitórias da minha vida.

Ao meus irmão, **Vinicíus** e sua família que sempre foi, é, e sempre será o meu melhor amigo.

A minha esposa **Gleicielle** dedico mais esta vitória que conseguimos juntos.. Pelo respeito, integridade, dedicação e amor dedicados a mim. A você o meu amor, e a minha admiração.

Enfim a toda **minha família**, pois o amor e a vontade de vê-los bem, de poder ajudá-los é a razão da minha luta.

Aos meus valiosos e amados **AMIGOS**, pela paciência, compreensão, carinho e amor, por me apoiarem sempre, em tudo que almejo, o amor que vocês me dão é um dos combustíveis para que eu prossiga lutando pelos meus objetivos, e crendo na vitória que dividirei com vocês.

Aos alunos Thaiane, Estela, Amanda e Leonardo pela contribuição que este projeto fosse adiante.

À Prof^a. Dra. Sanívia Ap. de Lima Pereira, professora da disciplina de Patologia, pelo auxílio nas análises histológicas, pelo apoio na confecção deste trabalho, e pelas valiosas contribuições.

Ao Prof Tony Paiva Paulino, por ter sido um amigo. Me inspirou a gostar do conhecimento e a ser um educador, assim como ele.

Ao Funcionário do Biotério Central da Universidade de Uberaba, Luiz Fernando, meus agradecimentos pela ajuda no tratamento e manutenção dos animais.

Aos Funcionários do laboratório, Guilherme, Raiane, Aline e Andréia, pelos esforços feitos para que as pesquisas fossem realizadas.

Às secretárias da Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Extensão da Universidade de Uberaba, Alessandra Scoda e Rubiana Vieira Ripposati, obrigado pela atenção e carinho que sempre tiveram comigo, durante todo o período em que estivemos juntos.

RESUMO

O laser vem se mostrando uma excelente ferramenta auxiliar para recuperações de acidentes que envolvem nervos e principalmente no controle da resposta inflamatória em periodontites, capaz de modular a síntese de citocinas, estimular a proliferação de células e até atuar na hipersensibilidade dental. Porém existem muitos parâmetros a serem elucidados sobre o mecanismo de ação e no estabelecimento de um protocolo ideal para uso do laser com finalidade odontológica. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação do laser de 660nm, a 10J/cm² de fluência no tecido periodontal de ratos *Wistar* com periodontite induzida por ligadura. Para isso, foi induzido periodontite através da ligadura em torno dos primeiros molares inferiores (direito e esquerdo), por sete dias. Após este período, a ligadura foi retirada e os animais foram divididos em três grupos: um grupo foi sacrificado imediatamente, um grupo foi tratado com a irradiação do laser por seis dias e o terceiro grupo permaneceu esse mesmo período em tratamento algum. Um grupo controle sem ligadura também foi utilizado. Em seguida, os animais foram eutanasiados e as mandíbulas foram descalcificadas e, juntamente com fragmentos de gengiva, foram submetidos à análise histológica. Para visualização dos leucócitos e reabsorção óssea foi usada coloração HE; para mastócito foi utilizado coloração com fucsina ácida e azul de toluidina e para evidenciar o colágeno usou-se a coloração picrossírius. Os resultados obtidos sugerem que a aplicação do laser não tem efeito no recrutamento de leucócitos. Para mastócitos, os resultados demonstram que o grupo irradiado com laser teve menor densidade de células que o grupo que não recebeu irradiação, embora não houve diferença estatística entre eles. Os resultados obtidos ainda demonstraram que a irradiação do laser fez com que houvesse maior deposição de colágeno, porém não se observou diferença estatisticamente significativa para o grupo não tratado. Quanto a reabsorção óssea, o laser não foi eficaz em diminuir ou reparar a perda óssea. Dessa forma, podemos concluir que nas condições testadas, o laser não tem eficácia no tratamento da periodontite induzida.

Palavras-chave: laser, leucócitos, mastócitos, colágeno, reabsorção óssea.

ABSTRACT

The laser has proven to be an excellent tool to assist recovery from accidents involving nerves and mostly in control of the inflammatory response in periodontitis, able to modulate cytokine synthesis, stimulate cell proliferation and to act in dental hypersensitivity. But there are many parameters to be elucidated about the mechanism of action and the establishment of a protocol ideal for use in laser dentistry with purpose. The aim of this study was to evaluate the effect of 660nm laser, with a fluency of $10\text{J}/\text{cm}^2$ in periodontal tissue of rats with ligature-induced periodontitis. For this, periodontitis was induced by ligation around the first molars (left and right) for seven days. After this period, the ligature was removed and the animals were divided into three groups: one group was sacrificed immediately, one group was treated with laser irradiation for six days and the third group remained the same period without treatment. A control group, without ligation, was also used. Then, the animals were euthanized and the jaws were decalcified and, along with fragments of gingiva, were subjected to histological analysis. For visualization of leukocytes and bone resorption was used HE staining; mast cells was stained with acid fuchsin and toluidine blue. To highlight collagen we used to picrosirius stain. The results suggest that laser application has no effect on leukocyte recruitment. To mast cells, the results demonstrate that the laser group had lower cell density than those animals that received no irradiation, although without statistical difference between them. The results also showed that laser irradiation had caused greater collagen deposition, but there was no statistically significant difference for the untreated group. About bone resorption, the laser was not effective in reducing bone loss or repair. Thus, we conclude that under the conditions tested, the laser is not effective in the treatment of induced periodontitis.

Key words: laser, leucocyte, mast cell, collagen, bone resorption.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Componentes do periodonto de sustentação.....	17
Figura 3: Ratos da linhagem Wistar usados no experimento.	27
Figura 4: Fluxograma do experimento.....	28
Figura 5: Injeção intraperitoneal da solução anestésica de Xilazina e Ketamina para a colocação das ligaduras e indução do processo periodontal.	28
Figura 6: Separação das ameias entre o primeiro e secundo molares utilizando uma lima endodôntica #40, abrindo espaço para inserir a ligadura induzirá à periodontite.....	29
Figura 7: Inserção da ligadura ao redor do primeiro molar inferior esquerdo.	29
Figura 8 – Ligadura fixada no primeiro molar esquerdo.	30
Figura 9: Realização do tratamento com o aparelho LASERPULSE. Caneta Laser 660nm, operando de modo contínuo com a dose de 10 J/cm ² , por 10 (dez) segundos e uma distância de aproximadamente 05 cm, durante 06 (sete) dias.	31
Figura 10: Cortes Histológicos da gengiva dos primeiros molares inferiores de ratos <i>Wistar</i> adultos, corados pelo método da Hematoxilina-Eosina. (A): animais eutanasiados pós 7 dias de ligadura. (B) animais eutanasiados após 7 dias de ligadura seguidos de 7 dias de tratamento com luz laser 660 nm (C) animais eutanasiados após 7 dias de ligadura seguidos de 7 dias de evolução natural (sem tratamento com laser). (D) Eutanásia realizada sem a colocação das ligaduras nem tratamento com laser. (controle). Aumento de 1000X. As setas indicam leucócitos.	36
Figura 12: Cortes histológicos de gengiva dos primeiros molares inferiores de ratos da raça <i>Wistar</i> adultos, coradas pelo método de picro sirius. (A): animais eutanasiados pós 7 dias de ligadura. (B) animais eutanasiados após 7 dias de ligadura seguidos de 7 dias de tratamento com luz laser 660 nm (C) animais eutanasiados após 7 dias de ligadura seguidos de 7 dias de evolução natural (sem tratamento com laser). (D) Eutanásia realizada sem a colocação das ligaduras nem tratamento com laser (controle). Aumento de 630X. As setas indicam regiões de colágeno, marcadas pelo programa axioVision 4. Na Figura “A” em vermelho está a marcação feita pelo programa.	40
Figura 13: Cortes histológicos em mandíbulas nos primeiros molares inferiores de ratos da raça <i>Wistar</i> adultos. As setas indicam a raiz MV, e os círculos indicam a formação do osso. (A), a Raiz MV parcialmente envolvida por osso (B) e essa mesma raiz totalmente envolvida por osso (C). Aumento de 100X. Coloração HE.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Densidade de leucócitos/cm ² (Média±DP), analisada após sete dias com ligadura e diferentes tratamentos após a retirada da ligadura.	34
Tabela 2: Média±Desvio Padrão da densidade de leucócitos/cm ² analisado após sete dias com ligadura.	37
Tabela 3: Média±Desvio Padrão da densidade de colágeno em porcentagem de área.	39
Tabela 4: Dados da profundidade de reabsorção óssea (x 6µm), analisado após sete dias com ligadura e seis dias de tratamento com laser 660nm e dose de luz de 10J/cm ²	41

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Densidade de leucócitos/cm², analisado após sete dias com ligadura. Grupo A: Ligaduras retiradas após sete dias e eutanásia realizada imediatamente. Grupo B: Ligaduras retiradas após sete dias, tratamento com laser 660 nm, 10J/cm² por seis dias, eutanásia realizada no sétimo dia. Grupo C: Ligaduras retiradas após sete dias, não foi realizado o tratamento, eutanásia realizada após sete dias. Grupo D: Eutanásia realizada sem a colocação das ligaduras. (controle). (*) estatisticamente significativa (p>0,05). Teste one way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni. DP = Desvio Padrão. 35
- Gráfico 2:** Gráfico da densidade de mastócitos, analisado após sete dias com ligadura. Grupo A: Ligaduras retiradas após sete dias, eutanásia realizada. Grupo B: Ligaduras retiradas após sete dias, tratamento por seis dias, eutanásia realizada no sétimo dia. Grupo C: Ligaduras retiradas após sete dias, não foi realizado o tratamento, eutanásia realizada no sétimo dia. Grupo D: Eutanásia realizada sem a colocação das ligaduras. (controle). (*)estatisticamente significativa (p<0,01). Teste on way ANOVA, pós-teste de Bonferroni..... 37
- Gráfico 3.** Formação de colágeno (em área/%) analisada após sete dias com ligadura. Grupo A: Ligaduras retiradas após sete dias e eutanásia realizada. Grupo B: Ligaduras retiradas após sete dias, tratamento por seis dias, eutanásia realizada no sétimo dia. Grupo C: Ligaduras retiradas após sete dias, não foi realizado o tratamento, eutanásia realizada após sete dias. Grupo D: Eutanásia realizada sem a colocação das ligaduras. (controle). (*) estatisticamente significativa (p<0,001). Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, comparando todos os pares de colunas..... 39
- Gráfico 4:** Gráfico de profundidade de reabsorção óssea (x 6µm), analisado após sete dias com ligadura e seis dias de tratamento com laser 660nm e dose de luz de 10J/cm². Grupo A: Sete dias com ligadura, seguido de eutanásia imediatamente após a retirada da ligadura. Profundidade em x 6µm. Grupo B: Sete dias com ligadura, tratamento com laser por seis dias após a remoção das ligaduras, seguido de eutanásia no sétimo dia. Profundidade em x 6µm. Grupo C: Sete dias com ligadura, seguidos por seis dias de evolução natural (sem tratamento com laser) após a remoção das ligaduras, eutanásia no sétimo dia. Profundidade em x 6µm. Grupo D: Sem ligadura. (controle). Profundidade em x 6µm. (*)estatisticamente significativa (p<0,001). Teste on way ANOVA, pós teste de Bonferroni..... 41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP (Adenosina Tri-Fosfato)

cAMP- Adenosina Monofosfato Cíclico

CCO: Citocromo c oxidase

ERO's: Espécies Reativas de Oxigênio

IL-1: interleucina 1

JNK: jun N-kinase

Laser InGaAsP: Índio-Gálio-Arsênio-Fósforo

Laser Nd:YAG: neodímio - Dopado com ítrio e alumínio granada)

LED: Diodo Emissor de Luz

MAPK- Mitogen-activated protein kinases

TFD: Terapia Fotodinâmica

TNF: Fator de Necrose Tumoral

UNIUBE: Universidade Uberaba

HE: Hematoxilina/Eosina

UV: Ultra-violeta

MV: Mésio-vestibular

ERK: Extracellular signal-regulated kinases

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Periodontite.....	17
2.2 Terapia fotodinâmica	19
2.3 Fotobiomodulação	19
3 HIPÓTESE	23
4 OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo Geral.....	24
4.2 Objetivo Específico	24
5 JUSTIFICATIVA	25
6 MATERIAIS E MÉTODO	26
6.1 Animais.....	26
6.2 Grupos e desenho experimental.....	27
6.3 Indução da Periodontite.....	28
6.4 Tratamento com Laser.....	30
6.5 Anestesia e remoção do material a ser analisado	31
6.6 Desmineralização e processamento histológico.....	31
6.7 Quantificação do osso alveolar absorvido	32
6.8 Quantificação de Mastócitos.....	32
6.9 Quantificação de leucócitos.....	32
6.10 Quantificação de colágeno	33
6.11 Análise estatística.....	33
7 RESULTADOS	34
7.1 Análise Histológica de Leucócitos	34
7.2 Análise Histológica de Mastócitos	36
7.3 Análise Histológica de Colágeno	38
7.4 Análise da Reabsorção Óssea	40
8 DISCUSSÃO	43
9 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO – Aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal	52
APÊNDICE – Artigo publicado	54

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é uma reação inflamatória infecciosa dos tecidos gengivais (gingivite) ou suporte dos dentes: ligamento periodontal, cemento e osso alveolar (periodontite) devido à ação de um grupo de bactérias específicas, que se manifestam provocando danos nos tecidos periodontais (BECK, 1998). Os lipopolissacarídeos presentes nas paredes celulares das bactérias gram-negativas são importantes produtos citotóxicos e estão associados ao início e à progressão da doença periodontal (ALDO, 2004). A inflamação pode ser aguda ou crônica e essa distinção tem relação com a velocidade de instalação dos sintomas referentes ao processo inflamatório. Características morfológicas como o extravasamento de líquidos e de células do sangue para o interstício levam a um quadro característico de tumor, rubor, calor e dor, que são sinais constantes em um processo inflamatório.

Os grânulos contidos no interior das células de defesa são liberados no meio extracelular provocando lesão também em células sadias (FUCHS *et al.*, 2007). Outras células como linfócitos, plasmócitos, mastócitos, monócitos, eosinófilos e macrófagos também participam, atuando na resposta adaptativa do hospedeiro ao agente agressor (VON KOCKRITZ-BLICKWEDE *et al.*, 2008)

A inflamação é um processo dinâmico e mediado. Citocinas e quimiocinas sinalizam o local para que células de defesa possam ser recrutadas para o sítio de atuação específico. Citocinas como TNF- α , IL-1, mediadores como histamina, leucotrienos, prostaglandina E₂, e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's); promovem uma série de eventos vasculares, como dilatação dos vasos, diapedese, quimotaxia, além de necrose, dor (SUDA *et al.*, 1992; RICCIONI *et al.*, 2009; SAGE e CARMAN, 2011).

Apesar de a inflamação ser um processo importante para o organismo, as reações que seguem com a mesma, como edema e liberação de mediadores químicos, afetam terminações nervosas causando dor, além da possibilidade de uma resposta inflamatória exacerbada. Quando a produção de citocinas como IL-1, TNF- α , e PgE2 são diminuídas, conseqüentemente os efeitos causados pela inflamação também são diminuídos (SHAHARA *et al.*, 2008) (CHRISTODOULOU e CHOY, 2006).

Assim, diferentes mediadores químicos influenciam na migração das células para os tecidos, sendo de grande importância para opsonização, fagocitose e reparo tecidual, visando destruir ou isolar um agente nocivo, desencadeando uma série de eventos que tentam curar e reconstituir o tecido danificado (JENSEN, 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Periodontite

A periodontite é resultante da extensão do processo inflamatório iniciado na gengiva para os tecidos de suporte do periodonto, sendo estes: osso alveolar, ligamento periodontal e cimento (FIGURA 1).

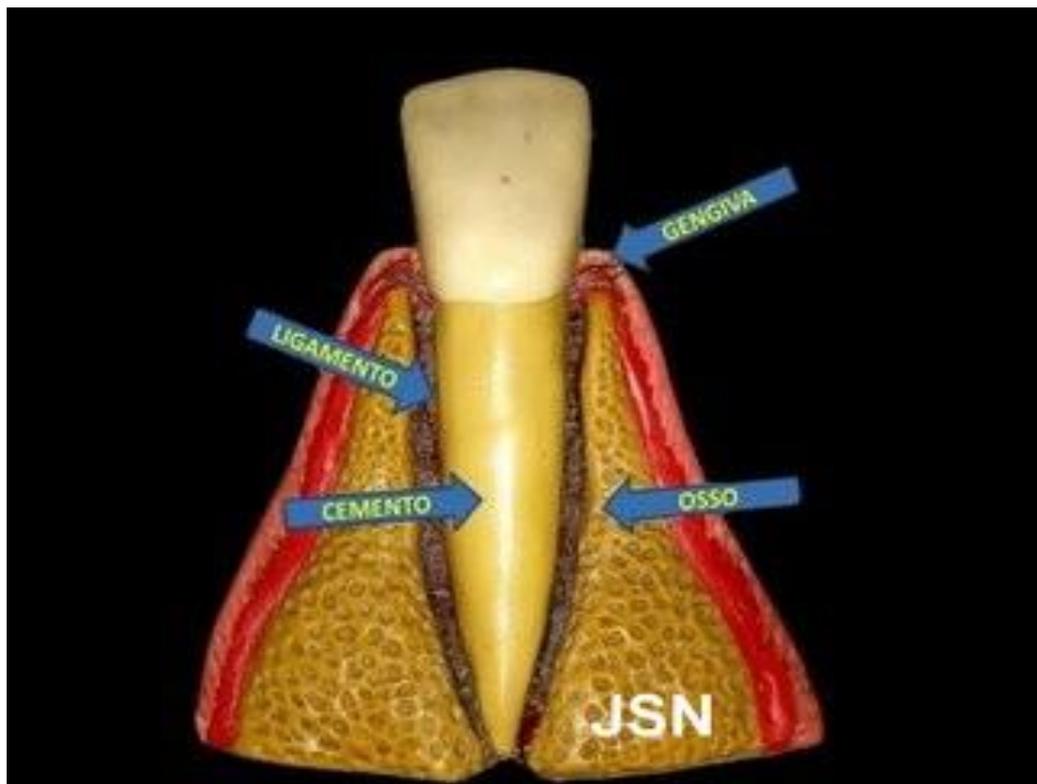


Figura 1: Componentes do periodonto de sustentação. Fonte: <http://perioclinic.blogspot.com.br/2009/06/o-periodonto.html>, consultado em 11/02/2013.

A periodontite (FIGURA 2) é uma das principais causas de perda de dentes em adultos e a principal causa em idosos, devido à destruição, em longo prazo, das estruturas do periodonto, ou seja, estruturas de sustentação do dente, durante as manifestações clínicas (Hiperemia, sangramento) ao longo da vida (PENDYALA, 2013).



Figura 2: Aspectos da periodontite (recessão, perda óssea, sangramento gengival. Fonte: <http://anaerobicinfections.blogspot.com.br/p/central-nervous-system-eye-and-dental.html>. Consultado em 11/02/2013.

A periodontite pode promover mobilidade e mudança de posição dos dentes, resultando em manifestações clínicas corriqueiras como sangramento gengival, alteração do paladar, sensibilidade e mudança de coloração dental, dores e desconfortos gengivais, além de mau hálito e tártaro, oriundos da colonização de bactérias seguido de destruição óssea que há na região da inflamação, onde inclusive pode haver acúmulo de material purulento (SRINIVAS e PARRY, 2012).

Os problemas relacionados ao periodonto (Osso alveolar, Ligamento periodontal e cemento) constituem um desafio aos odontólogos, visto que os tratamentos disponíveis hoje são de longa duração e com prognóstico duvidoso, pois dependem da colaboração dos pacientes em ambientes que vão além do consultório para que se obtenha melhora nos quadros clínicos de inflamação (NEWMAN E CARRANZA, 1997).

Limitações importantes, tais como dificuldade de acesso em bolsas profundas, sulcos e furcas levaram ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas neste processo inflamatório (SGOLASTRA, 2010). Algumas dessas estratégias utilizam a luz como agente terapêutico, associada ou não a drogas que atuarão visando o controle do processo inflamatório.

2.2 Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que utiliza uma droga sensível à luz, que em um determinado comprimento de onda é excitada fazendo com que espécies reativas de oxigênio sejam liberadas nos tecidos causando lesão às células (HARRIS *et al.*, 2005). Essas espécies reativas de oxigênio, tais como radicais superóxido e oxigênio singlete são potentes agentes oxidantes, levando a morte celular, inclusive de bactérias presentes na região de aplicação (SHARMAN *et al.*, 1999).

A TFD utilizando LED (diodo emissor de luz, comprimento de onda 580 nm) como fonte de luz e rose bengal como agente fotossensível foi eficaz no tecido gengival de ratos da raça Wistar com doença periodontal induzida por ligadura. Por causa dos efeitos da luz, a TFD significativamente suprimiu a ativação das citocinas, diminuindo resposta inflamatória e, conseqüentemente, a reabsorção óssea (CARVALHO *et al.*; 2011). O trabalho também evidenciou que o tratamento com a luz por si só também reduziu significativamente a liberação de TNF- α . Assim, a diminuição da exacerbação da resposta imuno-inflamatória é uma importante comprovação de que a TFD pode ser uma estratégia auxiliar na redução dos níveis inflamatórios, evitando a reabsorção do osso e auxiliando no tratamento da doença periodontal.

2.3 Fotobiomodulação

A fotobiomodulação usa diodos emissores de luz (LEDs) ou lasers de baixa energia, que emitem luz vermelha visível, próximo a faixa do infravermelho. Luz nesta faixa de tecido penetra razoavelmente bem, e não tem as propriedades mutagênico/cancerígenas de luz UV, e atua sobre um fotorreceptor endógeno, que

provavelmente age para iniciar cascatas de vias de sinalização alteradas (PEPLOW *et al.*, 2010).

Estudos estão sendo feitos para avaliar as várias características benéficas da radiação laser, tais como efeitos hemostáticos e bactericidas, que podem levar a melhores resultados no tratamento periodontal (QUIRK *et al.*, 2011). Depois de raspagem e alisamento radicular, a laserterapia foi capaz de reduzir significativamente os índices gengivais, de profundidade de sondagem e volume de fluido gengival (de PAULA EDUARDO *et al.*, 2010).

Foi observado que a remoção supra e subgengival de depósitos bacterianos por debridamento mecânico (raspagem e alisamento radicular) utilizando instrumentos manuais não removem por completo bactérias e suas toxinas, motivo pelo qual não se alcança eficácia rápida no tratamento (CARUSO *et al.*, 2008).

Atualmente há relatos de uso do laser em diferentes áreas da saúde como terapia contra inflamação e tratamento de inflamações hematoculares (TUGAL *et al.*, 2010).

Após induzir inflamação por carragenina e utilizar laser de baixa potência; foi constatado que, três horas após a aplicação, as doses do laser com $7\text{J}/\text{cm}^2$ e comprimentos de ondas específicos em 660 e 684 nm foram eficazes para reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1, TNF, IL-6 (ALBERTINI *et al.*, 2008).

O tecido epitelial danificado foi capaz de absorver eficientemente a luz em vários comprimentos de onda, sendo que a fotoestimulação com laser a 660nm apresentou melhores resultados nas fases iniciais de cicatrização de feridas, enquanto utilização de luz laser a 780nm teve efeitos benéficos, com o crescimento do tecido recém-formado semelhante à derme normal (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

O laser de baixa intensidade foi capaz de reduzir ligeiramente a intensidade da reação inflamatória, bem como melhorar substancialmente o processo de epitelização, além de estimular a deposição de fibras de colágeno nas fases finais da cicatrização de feridas (GONZAGA *et al.*, 2009). Parâmetros do laser InGaAsP (Índio-Gálio-Arsênio-Fósforo) pré-definidos, em combinação com a técnica de irradiação contínua causou bioestimulação, proliferação e migração de fibroblastos gengivais humanos em culturas *in vitro*.

O uso de lasers como terapia auxiliar para a doença periodontal pode melhorar a cicatrização do tecido por efeitos bactericidas e desintoxicação. Vários sistemas de laser, com características diferentes e comprimentos de onda também

diferentes, têm sido utilizados no combate à doença periodontal com o intuito de aperfeiçoar o tratamento. Um exemplo é o laser de alta potência Nd:YAG (Neodímio dopado com Ítrio e Alumínio Granada) capaz de excelentes efeitos hemostáticos e bactericidas em tecidos moles como o periodonto. No entanto, este laser não é útil para o tratamento de tecidos dentais duros (CARUSO *et al.*, 2008).

A ação da luz do laser de baixa potência apresenta ação reguladora sobre a resposta inflamatória reduzindo a sintomatologia dolorosa e estimulando o reparo tecidual (PINHEIRO *et al.*, 2009).

A laserterapia leva ao benefício de modular tanto aspectos da doença periodontal e possíveis efeitos colaterais, assim como mostram influência em vários processos, como a inflamação do tecido mole, efeitos de cura óssea, e outros como dor pós-operatória e hipersensibilidade dentária pós-tratamento, (YILMAZ *et al.*, 2002).

A ação da fotoestimulação com irradiação infravermelha de baixa potência melhora a produção de energia mitocondrial, aumenta a proliferação celular e reduz a apoptose. Assim, a utilização de aparelhos com comprimento de onda entre 630 e 830 nm e potência entre 1 e 10 J/cm² têm demonstrado efeitos benéficos tais como redução da apoptose, aumento da proliferação celular e aumento produção de ATP (QUIRK *et al.*, 2011)

O estudo de Lui, Corbet e Jin (2011) sugere que um tratamento convencional (raspagem sub e supragengival) combinado a fotobiomodulação com laser baixa intensidade poderia ser benéfico para tratamento não cirúrgico da periodontite crônica em curto prazo. Resultados sugerem que mais estudos são necessários para avaliar a eficácia em longo prazo da laser terapia de baixa intensidade como adjuvante no tratamento não cirúrgico de periodontite.

Resultados obtidos com laserterapia de baixa intensidade como tratamento auxiliar à raspagem e alisamento radicular para periodontite induzida em ratos tratados com dexametasona sugerem que a utilização do laser de baixa intensidade (660nm) foi um auxiliar eficaz para combater a periodontite induzida (GARCIA *et al.*, 2010).

Embora os primeiros estudos identificassem a citocromo c oxidase mitocondrial como um fotorreceptor endógeno de fotobiomodulação, os estudos ainda não são claros a respeito dos mecanismos celulares e moleculares da

fotoestimulação. A fotobiomodulação está sendo pesquisada também em outras áreas além da Odontologia. Atualmente, as terapias de luz são amplamente utilizadas em seres humanos e também em animais. A aplicação de luz à terapêutica clínica inclui: terapia fotodinâmica, usada para matar células cancerosas; terapias UVA, usados para tratar uma variedade de doenças de pele, e fotobiomodulação, utilizada para promover o crescimento celular e recuperação de lesões (QUIRK *et al.*, 2011).

A estimulação celular provocada pela irradiação laser com laser de baixa potência se dá por meio de indução da via MAPK/ERK. A luz aplicada à mitocôndria faz aumentar a atividade da enzima citocromo-c oxidase, que faz parte da cadeia respiratória mitocondrial. Assim a atividade do potencial de membrana da mitocôndria é aumentada gerando mais ATP e cAMP. O laser também leva a fosforilação da enzima Jun N-Terminal K (JNK), que faz a ativação da AP-1 (enzima de transcrição) (PEPLOW *et al.*, 2010). Deste modo acredita-se que o mecanismo de proliferação celular ocorra desta forma.

3 HIPÓTESE

A hipótese do presente trabalho é que a irradiação com luz laser no comprimento de onda 660nm contribui para o reparo ósseo, para diminuição da resposta inflamatória quantificada pela contagem de mastócitos, leucócitos e para a produção de colágeno em mandíbulas de ratos induzidos à periodontite por ligadura.

5 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos têm surgido estudos que fazem uso do laser como uma alternativa ou uma ferramenta auxiliar para procedimentos de controle da resposta inflamatória periodontal, como em alguns procedimentos convencionais utilizados no tratamento da doença periodontal, como raspagem e alisamento radicular. Os estudos com laser são importantes por ser um método eficaz, pouco invasivo, sem efeito colateral por poder ser usado rotineiramente na clínica odontológica.

Estudos para mostrar a eficácia da fotobiomodulação no tratamento da periodontite, inclusive no aumento da produção de colágeno nos tecidos lesados são importantes. Entretanto, existem poucos estudos em relação aos efeitos benéficos do uso do laser tanto na área médica, como na odontológica.

Tendo em vista o exposto acima, o presente trabalho se justifica pelo fato de buscar esclarecer a eficácia e os possíveis mecanismos pelos quais a fotobiomodulação atua nas lesões periodontais.

6 MATERIAIS E MÉTODO

6.1 Animais

O estudo foi realizado com ratos machos adultos da linhagem Wistar, pesando entre 250g e 350g, provenientes da mesma ninhada e do Biotério da Universidade de Uberaba. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (FIGURA 3), 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 (Anexo 1).



Figura 3: Ratos da linhagem Wistar usados no experimento.

6.2 Grupos e desenho experimental

No total de dois experimentos, foram utilizados 40 animais, divididos em 4 (quatro) grupos:

Grupo A: Formado por 5 animais que permaneceram com a ligadura (ver FIGURA 8) por 7 dias e foram eutanasiados imediatamente após a remoção da ligadura.

Grupo B: Formado por 5 animais que permaneceram com a ligadura por 7 dias e, após a sua remoção, receberam sessões diárias de laser (660 nm) por 6 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, com 10 J/cm^2 no modo contínuo, aplicado de forma pontual ao redor da inserção gengival (FIGURA 10).

Grupo C: Formado por 5 animais que permaneceram com a ligadura por 7 dias e, após a sua remoção, permaneceram em recuperação espontânea (sem laserterapia) por sete dias, sendo então eutanasiados.

Grupo D: Formado por cinco animais que foram eutanasiados sem ter recebido a ligadura ou tratamento com laser (grupo controle).

A Figura 4 ilustra o fluxograma do experimento.

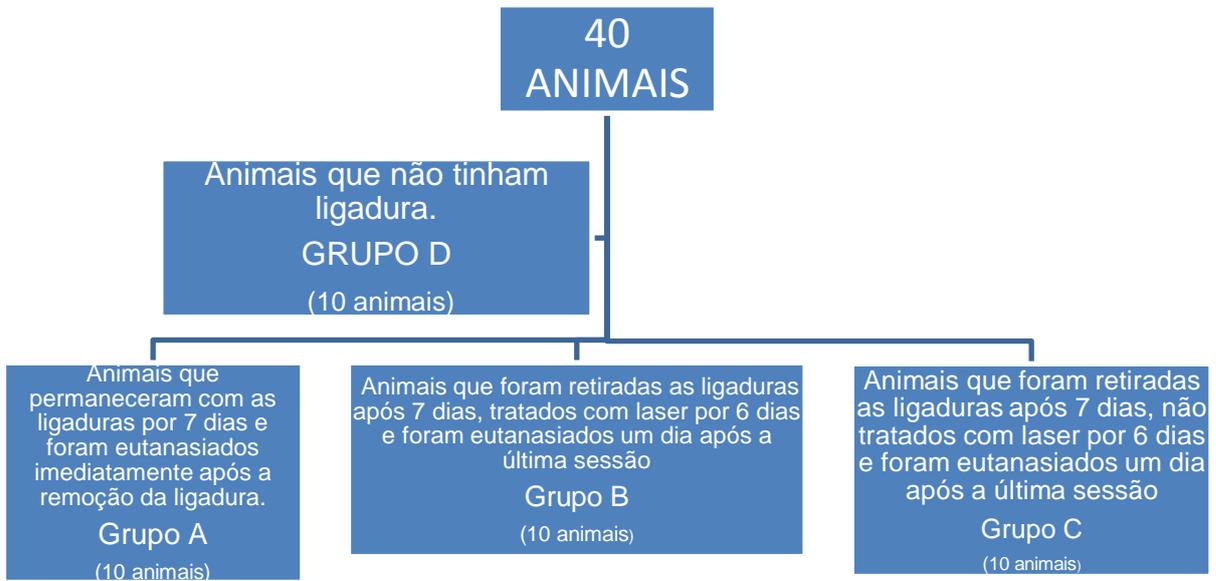


Figura 4: Fluxograma do experimento.

6.3 Indução da Periodontite

Os animais foram anestesiados utilizando Xilazina (relaxante muscular) e Ketamina (anestésico) na dose de 1,0 ml/kg do animal, administrada via intraperitoneal (FIGURA 5).



Figura 5: Injeção intraperitoneal da solução anestésica de Xilazina e Ketamina para a colocação das ligaduras e indução do processo periodontal.

Sobre uma mesa de suporte, os animais já anestesiados foram preparados para colocação de um fio de linha número 10, denominado “ligadura” (FIGURA 6).



Figura 6: Separação das ameias entre o primeiro e segundo molares utilizando uma lima endodôntica #40, abrindo espaço para inserir a ligadura induzirá à periodontite.

A ligadura foi colocada (imobilizada) em torno dos primeiros molares dos lados direito e esquerdo da mandíbula dos animais fixando-o com um nó, após a colocação da ligadura (FIGURAS 7 e 8). As ligaduras foram removidas após 06 (seis) dias, período suficiente para a indução da doença periodontal experimental, de acordo com estudos prévios (CARVALHO *et al*, 2011).



Figura 7: Inserção da ligadura ao redor do primeiro molar inferior esquerdo.



Figura 8 – Ligadura fixada no primeiro molar esquerdo.

6.4 Tratamento com Laser

Foi utilizado o aparelho LASERPULSE, da marca IBRAMED[®] acoplado a uma Caneta Laser 660nm (IBRAMED[®]). O aparelho opera no modo contínuo (usado para o tratamento neste trabalho) e pulsado, com possibilidade de escolha de 10 frequências de modulação: 2,5Hz, 5Hz, 10Hz, 20Hz, 75Hz, 150Hz, 300Hz, 700Hz 1KHz e 2KHz.

A fluência testada foi de 10 J/cm², 30mW, aplicada uma vez ao dia por dez segundos (tempo estabelecido de acordo com a frequência) de cada lado da mandíbula, durante sete dias, como relatado em dados da literatura (CARVALHO *et al.*, 2011)

Após estarem anestesiados e posicionados no suporte, os animais foram submetidos à terapia com laser aplicado a uma distância de aproximadamente 5 cm do primeiro molar inferior lado direito e esquerdo (FIGURA 9).



Figura 9: Realização do tratamento com o aparelho LASERPULSE. Caneta Laser 660nm, operando de modo contínuo com a dose de 10 J/cm^2 , por 10 (dez) segundos e uma distância de aproximadamente 05 cm, durante 06 (seis) dias.

6.5 Anestesia e remoção do material a ser analisado

Para a eutanásia dos animais, foi aplicado Xilazina e Ketamina (1 ml/Kg de peso corporal) intra-abdominal, seguido de laparotomia e ruptura diafragmática. 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 parti-las ao meio.

6.6 Desmineralização e processamento histológico

As gengivas foram retiradas e fixadas novamente em formol 10% tamponado, seguindo então para o processamento histológico de rotina. Já 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. Nesse momento, as peças de mandíbulas foram divididas em metades direita e esquerda, o incisivo foi removido e o fragmento com os 3 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.

6.7 Quantificação do osso alveolar absorvido

Utilizando um microscópio e a objetiva de 10X, identificamos em qual corte o cimento começava a aparecer na raiz méso-vestibular (MV) dos primeiros molares (direito e esquerdo). A partir do corte inicial identificado, 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.

6.8 Quantificação de Mastócitos

Para a quantificação dos mastócitos utilizamos 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, calculamos a densidade de mastócitos, sendo expressa em número de mastócitos por cm^2 .

6.9 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. Realizamos contagem dos mastócitos 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, calculamos a densidade de leucócitos, sendo expressa em número de leucócitos por cm^2 .

6.10 Quantificação de colágeno

A quantificação morfométrica de colágeno tipo II, e tipos III, foi realizada em lâminas coradas com picrossírus, e com a utilização de uma lente para luz polarizada, foi feita a quantificação da fibrose observada pelo programa Axio-Vision 4[®]. O sistema de análise de imagens utilizado foi com um microscópio com câmera para captura de imagens e um computador KS300 (Kontron Zeiss, Alemanha), objetiva de 63X. 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.

6.11 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa Graphpad Prism 4.0. Os resultados foram primeiramente dispostos em uma planilha eletrônica e em seguida procedeu-se a análise estatística. Em todas as variáveis foram testadas a distribuição normal pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* e a variância pelo teste de *Barlett's* (homogeneidade). Quando as suposições de normalidade e homogeneidade foram satisfeitas, utilizou-se para a comparação dos diferentes grupos análise de variância ANOVA com pós-teste de *Bonferroni* para comparação das variáveis em relação aos grupos, e os resultados foram expressos em média e desvio padrão (DP).

Quando 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's* e os resultados foram expressos em mediana, mínima e máximo.

7 RESULTADOS

7.1 Análise Histológica de Leucócitos

Os dados da avaliação de leucócitos apresentaram distribuição normal, sendo então apresentados em média \pm desvio padrão. O grupo tratado com laser após de retirada da ligadura (B) apresentou média de $618,16 \pm 164,3$ células/cm² enquanto o grupo não tratado (C) apresentou média de $606,02 \pm 272$ células/cm². O grupo “D” (controle sem ligadura) apresentou média de $540,5 \pm 81,71$ células/cm² enquanto o grupo eutanasiado imediatamente após a retirada da ligadura (A) apresentou média de $735,9 \pm 305,08$ células/cm² (TABELA 1). A análise dos dados mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando comparados entre si (GRÁFICO 1). A Figura 10 ilustra cortes de gengiva identificando leucócitos.

Tabela 1: Densidade de leucócitos/cm² (Média \pm DP), analisada após sete dias com ligadura e diferentes tratamentos após a retirada da ligadura.

Grupo	A	B	C	D
Média	735,9	618,16	606,02	540,5
DP	305	168	272	81,71

Grupo A: ligaduras retiradas após sete dias e eutanásia realizada. Grupo B: ligaduras retiradas após sete dias, tratamento por seis dias, eutanásia realizada no sétimo dia. Grupo C: ligaduras retiradas após sete dias, não foi realizado o tratamento, eutanásia realizada após sete dias. Grupo D: eutanásia realizada sem a colocação das ligaduras. (controle). ($p > 0,05$). Teste on way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni. DP = Desvio Padrão.

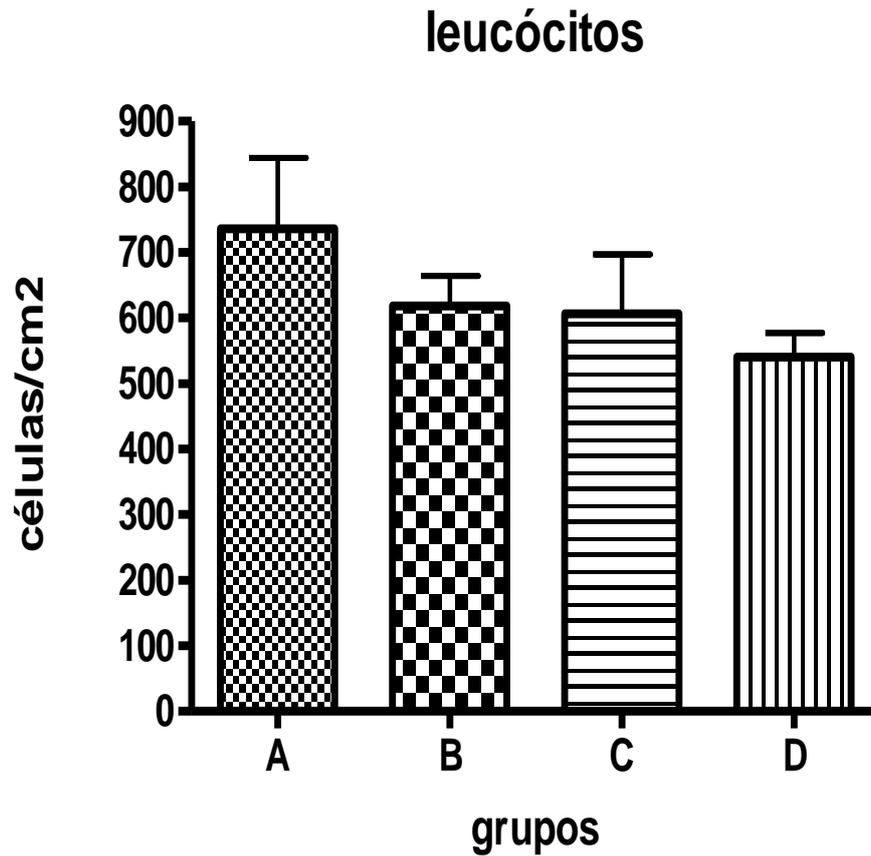


Gráfico 1: Densidade de leucócitos/cm², analisado após sete dias com ligadura. Grupo A: Ligaduras retiradas após sete dias e eutanásia realizada imediatamente. Grupo B: Ligaduras retiradas após sete dias, tratamento com laser 660 nm, 10J/cm² por seis dias, eutanásia realizada no sétimo dia. Grupo C: Ligaduras retiradas após sete dias, não foi realizado o tratamento, eutanásia realizada após sete dias. Grupo D: Eutanásia realizada sem a colocação das ligaduras. (controle). (*) estatisticamente significante ($p > 0,05$). Teste one way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni. DP = Desvio Padrão.

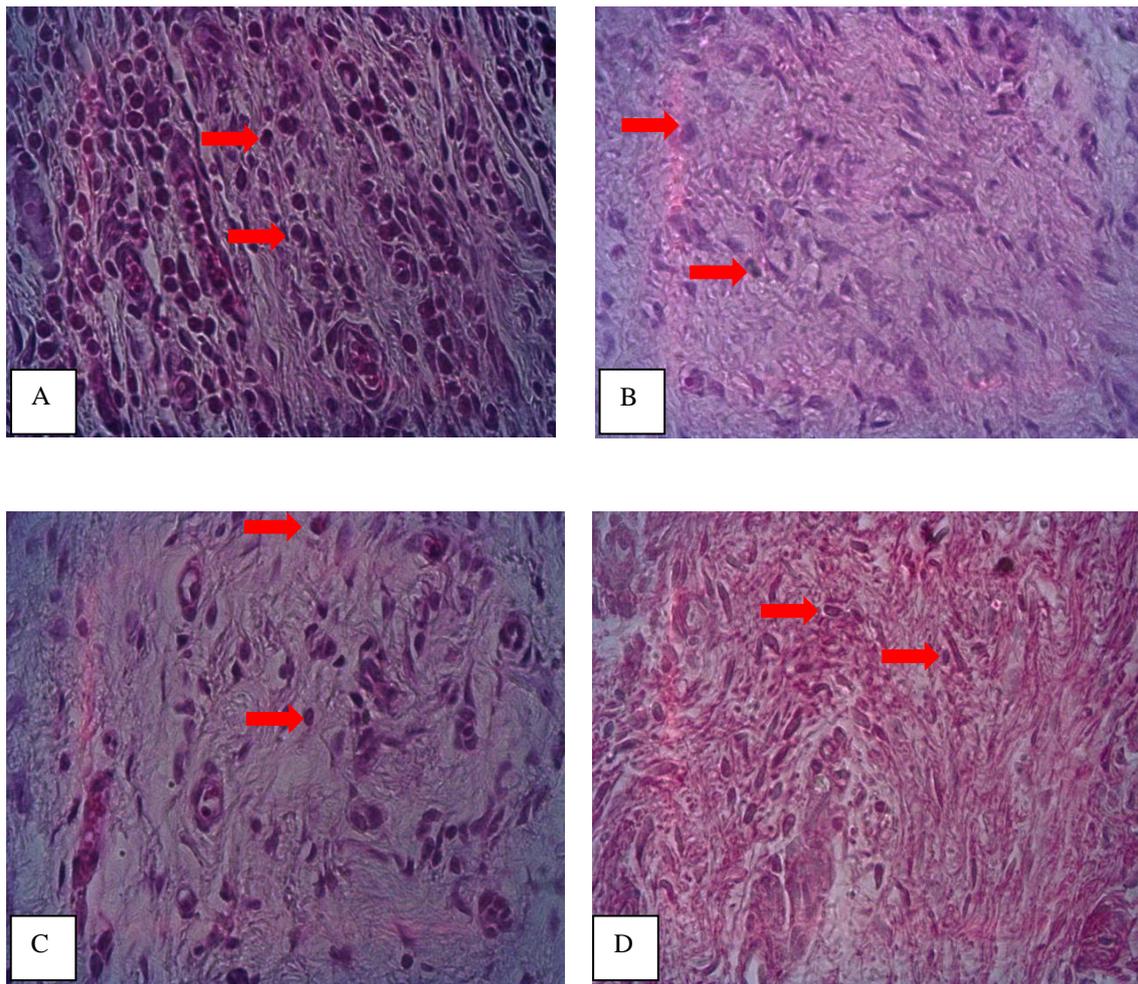


Figura 10: Cortes Histológicos da gengiva dos primeiros molares inferiores de ratos *Wistar* adultos, corados pelo método da Hematoxilina-Eosina. (A): animais eutanasiados pós 7 dias de ligadura. (B) animais eutanasiados após 7 dias de ligadura seguidos de 7 dias de tratamento com luz laser 660 nm (C) animais eutanasiados após 7 dias de ligadura seguidos de 7 dias de evolução natural (sem tratamento com laser). (D) Eutanásia realizada sem a colocação das ligaduras nem tratamento com laser. (controle). Aumento de 1000X. As setas indicam leucócitos.

7.2 Análise Histológica de Mastócitos

Os dados da avaliação de mastócitos apresentaram distribuição normal, sendo então apresentados em média \pm desvio padrão. A análise dos dados mostrou que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) apenas entre o grupo “D” (controle) que apresentou média de $9,192 \pm 2,374$ células/cm² e o grupo “A” (evolução sem aplicação do laser) que apresentou média de $3,758 \pm 2,938$ células/cm²

Quando é feita a comparação entre os todos os outros grupos demais grupos, observa-se que não há diferença estatística significativa entre eles, tendo o grupo

tratado com laser por seis dias após de retirada da ligadura (grupo B) apresentado média de $5,929 \pm 2,761$ células /cm², enquanto o grupo em que a ligadura foi removida com sete dias sem tratamento com laser terapia (C) apresentou média de $6,541 \pm 3,017$ células/cm² (TABELA 2). A Figura 11 ilustra exemplo de cortes de gengiva identificando mastócitos.

Tabela 2: Média±Desvio Padrão da densidade de leucócitos/cm² analisado após sete dias com ligadura.

Grupos	A	B	C	D
Média	3,758	5,929	6,541	9,192
DP	2,398	2,761	3,017	2,374

Grupo A: Ligaduras retiradas após sete dias e eutanásia realizada. Grupo B: Ligaduras retiradas após sete dias, tratamento por seis dias, eutanásia realizada no sétimo dia. Grupo C: Ligaduras retiradas após sete dias, não foi realizado o tratamento, eutanásia realizada após sete dias. Grupo D: Eutanásia realizada sem a colocação das ligaduras. (controle). DP = Desvio Padrão.

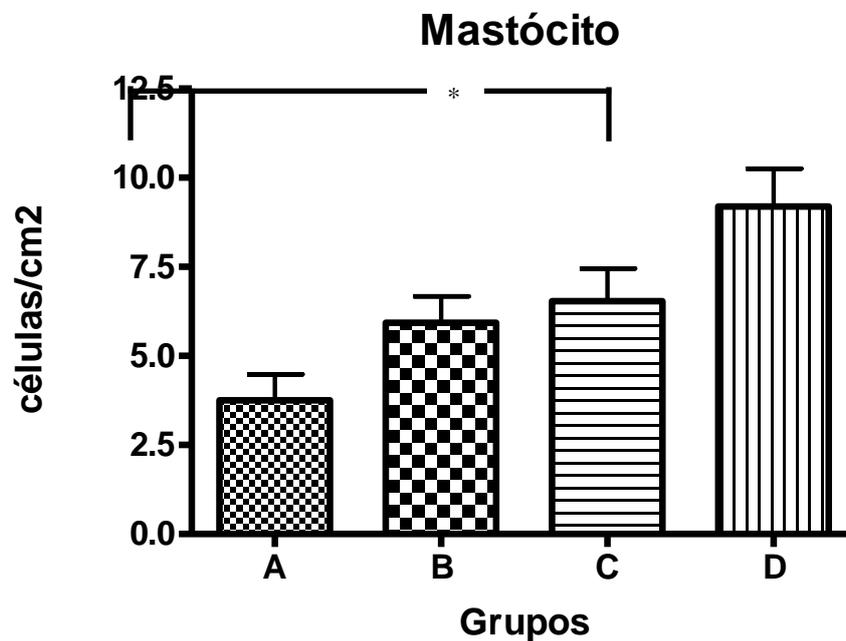


Gráfico 2: Gráfico da densidade de mastócitos, analisado após sete dias com ligadura. Grupo A: Ligaduras retiradas após sete dias, eutanásia realizada. Grupo B: Ligaduras retiradas após sete dias, tratamento por seis dias, eutanásia realizada no sétimo dia. Grupo C: Ligaduras retiradas após sete dias, não foi realizado o tratamento, eutanásia realizada no sétimo dia. Grupo D: Eutanásia realizada sem a colocação das ligaduras. (controle). (*)estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Teste on way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

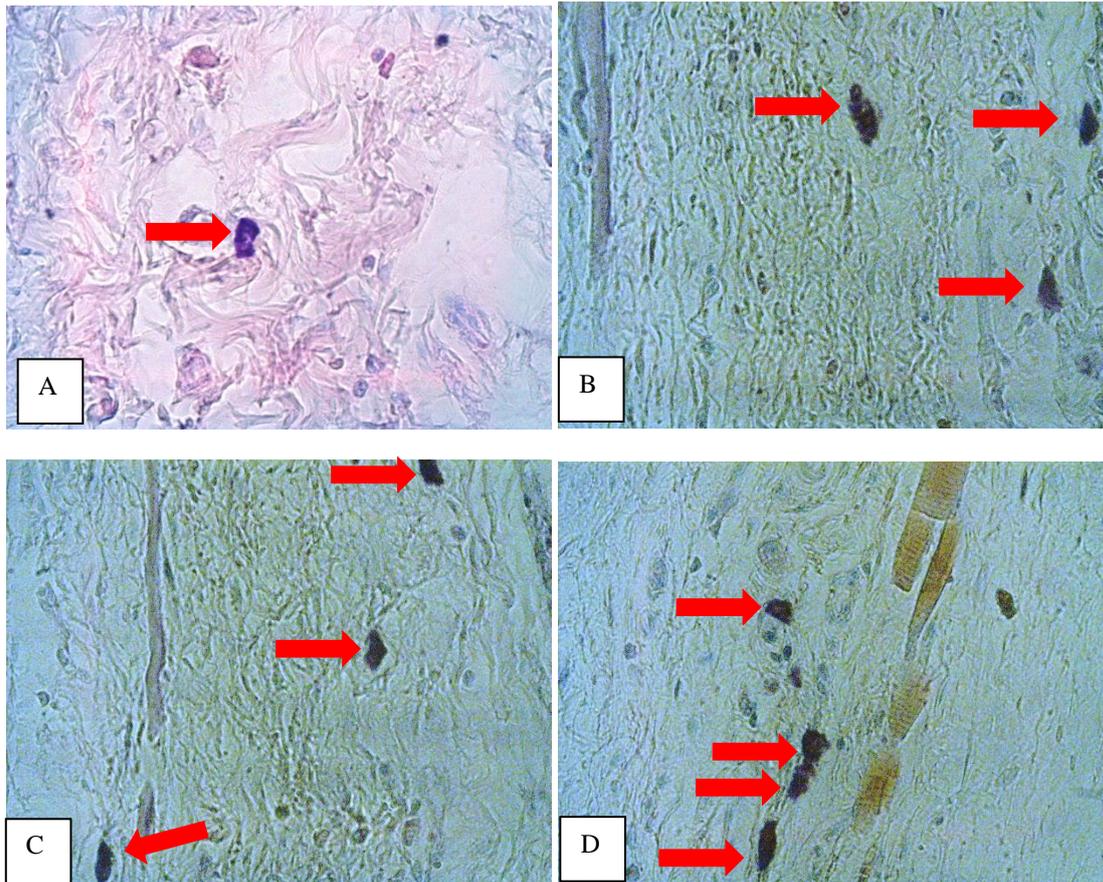


Figura 11: Cortes histológicos de gengiva dos primeiros molares inferiores de ratos da raça *Wistar* adultos, corados para identificação de mastócitos. (A): animais eutanasiados pós 7 dias de ligadura. (B) animais eutanasiados após 7 dias de ligadura seguidos de 7 dias de tratamento com luz laser 660 nm (C) animais eutanasiados após 7 dias de ligadura seguidos de 7 dias de evolução natural (sem tratamento com laser). (D) Eutanásia realizada sem a colocação das ligaduras nem tratamento com laser (controle). Aumento de 1000 X. As setas indicam mastócitos

7.3 Análise Histológica de Colágeno

Os dados da avaliação da densidade de colágeno não apresentaram distribuição normal, sendo então apresentados em valores de Mediana, Mínimo e Máximo. A análise dos dados mostrou que houve diferença estatisticamente significativa nas comparações entre o grupo “D” (controle), que teve mediana 1,23 porcentagem/área e os grupos A, B e C que apresentaram mediana de 1,71 porcentagem/área, 3,66 porcentagem/área, 3,34 porcentagem/área, respectivamente ($<0,001$). Quando comparados o grupo “B” (tratado com laser por seis dias após de retirada da ligadura) e o grupo “A” (ligadura retirada após sete dias, sem laser terapia) também houve diferença estatística significativa. O mesmo

ocorre para a comparação do grupo A com o grupo C (tratado com laser por seis dias após de retirada da ligadura) ($p < 0,001$) (GRÁFICO 3).

Apenas na comparação do grupo B (tratado com laser por seis dias após de retirada da ligadura) com o grupo C (ligadura removida com sete dias e não tratado com laser terapia) não houve diferença estatística significativa. Os dados referentes à análise de colágeno estão representados na Tabela 3. A Figura 12 ilustra cortes de gengivas identificando colágeno.

Tabela 3: Média±Desvio Padrão da densidade de colágeno em porcentagem de área.

Grupo	A	B	C	D
Mediana	1,71	3,66	3,335	1,23
Máximo	10,51	18,46	13,61	7,59
Mínimo	0,13	0,21	0,18	0,21

Grupo A: Ligaduras retiradas após sete dias e eutanásia realizada. Grupo B: Ligaduras retiradas após sete dias, tratamento por seis dias, eutanásia realizada no sétimo dia. Grupo C: Ligaduras retiradas após sete dias, não foi realizado o tratamento, eutanásia realizada após sete dias. Grupo D: Eutanásia realizada sem a colocação das ligaduras. (controle). (*) estatisticamente significativa ($p < 0,01$), **($p < 0,001$). Teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn's.

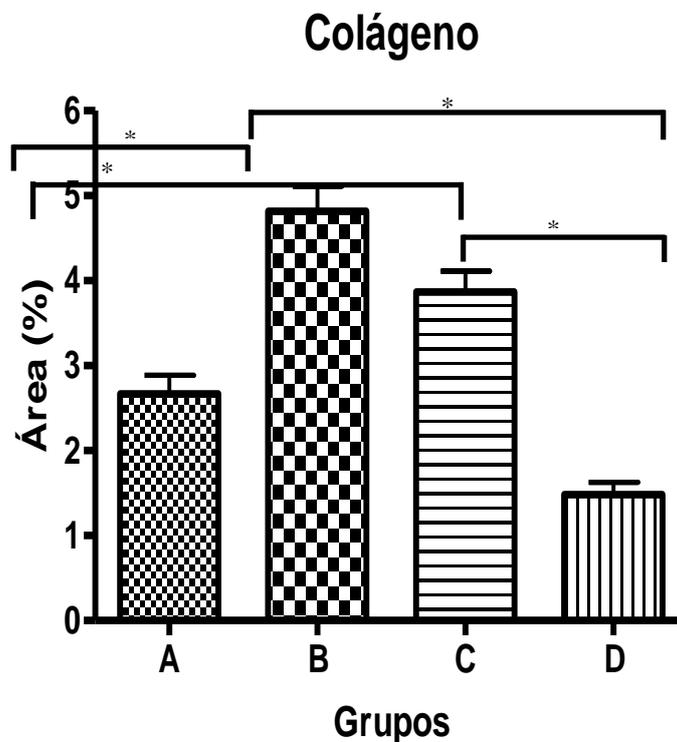


Gráfico 3. Formação de colágeno (em área/%) analisada após sete dias com ligadura. Grupo A: Ligaduras retiradas após sete dias e eutanásia realizada. Grupo B: Ligaduras retiradas após sete dias, tratamento por seis dias, eutanásia realizada no sétimo dia. Grupo C: Ligaduras retiradas após sete dias, não foi realizado o tratamento, eutanásia realizada após sete dias. Grupo D: Eutanásia realizada sem a colocação das ligaduras. (controle). (*) estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, comparando todos os pares de colunas.

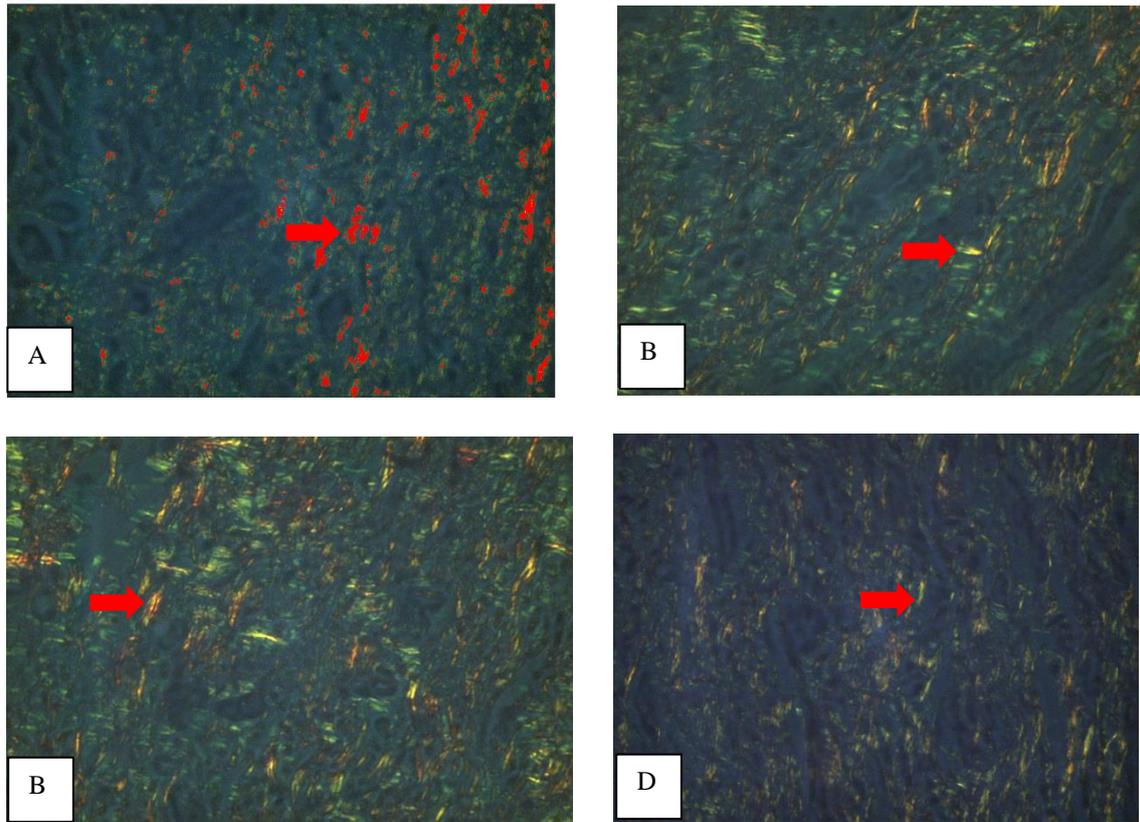


Figura 12: Cortes histológicos de gengiva dos primeiros molares inferiores de ratos da raça *Wistar* adultos, coradas pelo método de picro sirius. (A): animais eutanasiados pós 7 dias de ligadura. (B) animais eutanasiados após 7 dias de ligadura seguidos de 7 dias de tratamento com luz laser 660 nm (C) animais eutanasiados após 7 dias de ligadura seguidos de 7 dias de evolução natural (sem tratamento com laser). (D) Eutanásia realizada sem a colocação das ligaduras nem tratamento com laser (controle). Aumento de 630X. As setas indicam regiões de colágeno, marcadas pelo programa axioVision 4. Na Figura "A" em vermelho está a marcação feita pelo programa.

7.4 Análise da Reabsorção Óssea

Os dados da avaliação de reabsorção óssea apresentaram distribuição normal, sendo então apresentados em média \pm desvio padrão. A análise dos dados mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Ao avaliarmos o corte no qual a raiz méso-vestibular estava totalmente circundada pelo osso alveolar, observamos que o grupo controle apresentou a menor profundidade, com média de $15 \pm 9,42$ cortes, enquanto o grupo A teve como valor absoluto $35,5 \pm 12,76$ cortes, o grupo B $37,39 \pm 13,3$ cortes, e o grupo C $36,46 \pm 11,75$ cortes. Esses dados estão apresentados no Gráfico 4. A análise estatística revelou uma diferença significativa entre o grupo D (controle) e os grupos A, B e C ($p < 0,001$) (TABELA 4). Na comparação entre os demais grupos não houve

diferença estatística significativa. A Figura 13 ilustra cortes de mandíbula identificando áreas de reabsorção óssea.

Tabela 4: Dados da profundidade de reabsorção óssea (x 6 μ m), analisado após sete dias com ligadura e seis dias de tratamento com laser 660nm e dose de luz de 10J/cm².

Grupo	A	B	C	D
Média	35,50	37,39	36,46	15,00
DP	12,76	13,30	11,70	9,42

Grupo A: Ligaduras retiradas após sete dias e eutanásia realizada. Grupo B: Ligaduras retiradas após sete dias, tratamento por seis dias, eutanásia realizada no sétimo dia. Grupo C: Ligaduras retiradas após sete dias, não foi realizado o tratamento, eutanásia realizada após sete dias. Grupo D: Eutanásia realizada sem a colocação das ligaduras. (controle). (*)estatisticamente significativa (p<0,001). Teste on way ANOVA. DP= desvio padrão.

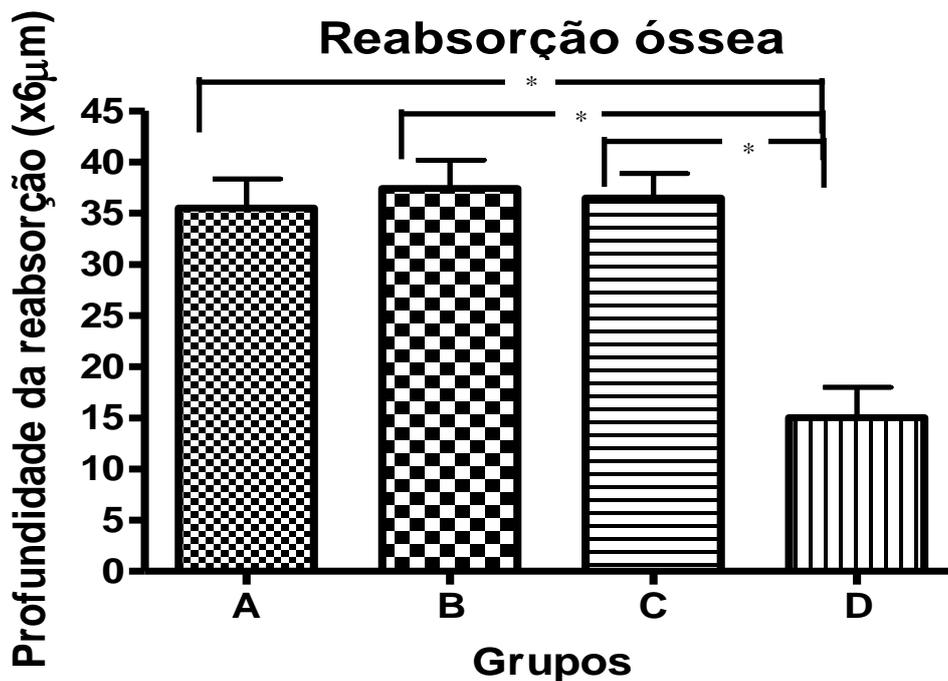


Gráfico 4: Gráfico de profundidade de reabsorção óssea (x 6 μ m), analisado após sete dias com ligadura e seis dias de tratamento com laser 660nm e dose de luz de 10J/cm². Grupo A: Sete dias com ligadura, seguido de eutanásia imediatamente após a retirada da ligadura. Profundidade em x 6 μ m. Grupo B: Sete dias com ligadura, tratamento com laser por seis dias após a remoção das ligaduras, seguido de eutanásia no sétimo dia. Profundidade em x 6 μ m. Grupo C: Sete dias com ligadura, seguidos por seis dias de evolução natural (sem tratamento com laser) após a remoção das ligaduras, eutanásia no sétimo dia. Profundidade em x 6 μ m. Grupo D: Sem ligadura. (controle). Profundidade em x 6 μ m. (*)estatisticamente significativa (p<0,001). Teste on way ANOVA, pós teste de Bonferroni.

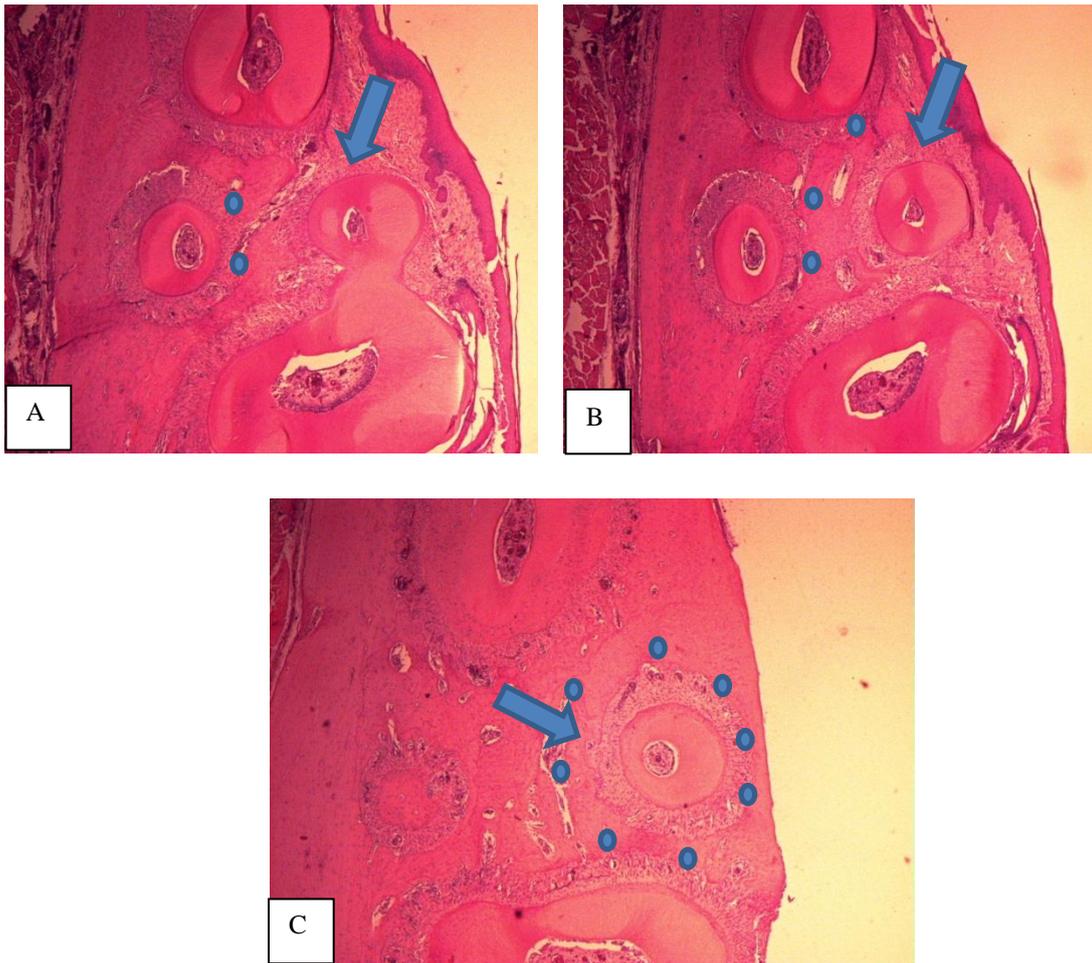


Figura 13: Cortes histológicos em mandíbulas nos primeiros molares inferiores de ratos da raça *Wistar* adultos. As setas indicam a raiz MV, e os círculos indicam a formação do osso. (A), a Raiz MV parcialmente envolvida por osso (B) e essa mesma raiz totalmente envolvida por osso (C). Aumento de 100X. Coloração HE.

8 DISCUSSÃO

No presente trabalho avaliou-se o efeito da fotobiomodulação com laser de 660nm na periodontite induzida por ligadura em ratos *Wistar*, que foram submetidos a um tratamento com doses diárias de laser a 10 J/cm^2 . Estudos de células em cultura demonstram claramente a capacidade que a irradiação com laser tem de modular (estimular) a proliferação celular através da atuação da luz sobre as cristas mitocondriais para aumento no fornecimento de ATP às células, embora muitos parâmetros ainda precisam ser elucidados, tais como o tempo de irradiação, o número de sessões e comprimento de onda ideal (PEPLOW *et al.*, 2010).

No presente estudo observamos maior quantidade de leucócitos mononucleares nos grupos com periodontite e sem irradiação com laser (grupo "A") do que no grupo tratado com laser (grupo B) e no grupo controle (grupo D). Mesmo que não tenha havido diferença significativa entre os grupos, os dados se assemelham aos de Levy (1976), que observou uma prevalência de células mononucleares na periodontite aguda, onde a quantidade de células tende a ser mais numerosa que na periodontite crônica. Os dados do presente estudo sugerem que o tempo de ligadura empregado no nosso estudo (sete dias) pode ter sido longo a ponto de o processo inflamatório ter deixado a fase aguda e iniciado a fase crônica do processo, explicando a redução nas quantidades de leucócitos.

Visto também que a diferença na densidade de leucócitos não foi estatisticamente significativa entre o grupo tratado com laser (B) e o grupo que evoluiu sem a irradiação do laser (C), sugerimos que o laser não teve atuação no recrutamento de leucócitos no tempo estudado (7 dias com a ligadura) e com a dose de laser utilizada no estudo (6 dias, 10 J/cm^2).

Quanto à análise de mastócitos, observamos que no grupo B (eutanásia realizada após seis dias de tratamento com laser) a densidade de mastócitos foi inferior que o observado no grupo D (controle), indicando que a irradiação do laser pode levar a uma diminuição na quantidade de mastócitos. Esses resultados diferem dos obtidos por Silveira *et al.*, (2008), que utilizaram 8 J/cm^2 e 36 segundos de irradiação antes da gengivectomia em humanos, não encontrando relação estatisticamente significativa para mastócitos entre o grupo tratado com laser e o grupo que não foi tratado com o laser. Esse fato pode ser explicado porque esses autores quantificaram os mastócitos imediatamente após a aplicação do laser, ao contrário do nosso estudo onde a quantificação foi feita após uma semana de irradiação com laser. Esses autores observaram, no entanto, que houve maior degranulação de mastócitos no grupo tratado com laser. Assim como os resultados do presente estudo apresentaram de fato, se a irradiação com laser estimula a degranulação dessas células, poderia ser explicado o seu menor número no grupo tratado com laser, uma vez que uma maior degranulação implicaria na necessidade de um número menor de células.

Os resultados deste presente estudo corroboram o estudo realizado por Nishioka *et al.*, (2012), que com o intuito de pesquisar os efeitos do LED (660nm) e o laser de baixa intensidade (670nm) em áreas onde são realizadas cirurgias plásticas, mostraram a quantidade encontrada de mastócitos não revelou ter um aumento em relação ao grupo controle após 4 dias de irradiação com o laser (670nm). O mesmo ocorreu com os nossos resultados, os quais tiveram seus valores da densidade de mastócitos $9,192 \pm 2,374 \text{ células/cm}^2$ e $5,929 \pm 2,761 \text{ células/cm}^2$ para grupo D e B respectivamente, sugerindo que o laser pode sim levar a uma diminuição no número de mastócitos.

Ainda corroborando nossos resultados, Sawasaki *et al.*, (2009) trataram lesão em mucosa oral denominadas *Epulis fissuratum*, em oito pacientes com um laser de AsGaAl (670nm, $8,0 \text{ J/cm}^2$, 5 mW, 4 min). Os autores observaram que a quantidade de mastócitos foi semelhante em amostras tratadas com laser e amostras não irradiadas, embora os índices de degranulação dos mastócitos nas amostras irradiadas foram significativamente mais elevados nas amostras irradiadas do que nas controles ($p < 0,05$), concluindo que a terapia com laser de baixa potência aumentou o número de mastócitos degranulados na mucosa oral, contribuindo assim para aumento do quadro inflamatório, assim como os obtidos por Silveira *et al.*,

(2008). Os resultados do presente estudo, mesmo não sendo significativos estatisticamente, mostraram que a quantidade de mastócitos no grupo B (tratado com laser) foi maior que a do grupo "A" (não irradiado). Entretanto uma maior liberação de histamina durante o processo agudo da inflamação sugere o aumento da vasodilatação, e conseqüentemente o aumento do edema (BRASILEIRO FILHO, 2007). Assim o edema faz com que o tecido conjuntivo fique túrgido, afastando as células umas das outras. Embora não tenhamos quantificado o edema, a Figura 11 sugere a ocorrência deste processo, podendo justificar a diferença encontrada na comparação dos grupos A e D.

Além disso, dados da literatura mostram que a irradiação com laser de baixa intensidade em ratos após o implante de tubos polietileno contendo cimento Endofill, o qual contém eugenol, uma substância irritante aos tecidos biológicos, reduz significativamente o número de mastócitos em relação ao grupo controle não tratado (BEBERT *et al.*, 2011). Nossos dados são corroborados por esse estudo, pois observamos diminuição da quantidade de mastócitos após a aplicação do laser em relação ao grupo que teve sua evolução sem irradiação com laser (C), mostrando que o laser é eficiente na diminuição de mastócitos em processos inflamatórios. O fato dos nossos resultados não serem significativos podem ser explicados pela diferença na dose de luz utilizada ou mesmo pelo tempo analisado.

Outro parâmetro analisado em nosso estudo foi a densidade de colágeno existente nos tecidos gengivais com e sem fotoestimulação com o laser de baixa intensidade (660nm). Nossos resultados mostraram que o grupo tratado com laser (B) apresentou valores estatisticamente significativos em comparação com todos os grupos, porém quando comparado ao grupo C (evolução sem tratamento com laser) os resultados foram maiores mas não foram significantes, assim como os resultados obtidos por Choi *et al.*, (2010), que relatam que há uma maior proliferação de fibroblastos nas primeiras 48 horas da irradiação do laser e após 72 horas não há diferença estatística para a proliferação destas células. Esses dados sugerem que o tempo de tratamento foi excessivo em nosso estudo e pode ter influenciado na formação de colágeno.

De acordo com o nosso estudo, a fotoestimulação com laser quando aplicada na periodontite induzida pela ligadura não incrementou o reparo ósseo da área lesada pela ligadura. Esses resultados contrariam estudos anteriores do grupo, utilizando terapia fotodinâmica (CARVALHO *et al.*, 2011), quando foi observado que

tanto a terapia fotodinâmica com Rose Bengal quanto a luz do LED sozinha levaram a resultados moduladores sobre citocinas pró-inflamatórias, e conseqüentemente aceleraram o processo de recuperação óssea após periodontite induzida por ligadura. Já os resultados do presente estudo mostram que houve diferença significativa apenas na comparação entre o grupo D (controle) e os demais grupos, demonstrando que em relação ao grupo controle, o laser não teve efeito em acelerar o processo de recuperação óssea após periodontite induzida por ligadura. Essa diferença entre os resultados pode ser explicada pelo fato de que o trabalho anterior foi realizado com luz proveniente do LED (580nm) associado a uma droga fotossensível (Rose Bengal) e o presente estudo ter utilizado apenas a irradiação com laser (660nm).

Segundo Lirani-Galvão et al., (2006) o uso do laser (780nm, 1,5MHz , 30mW de potência), foi eficaz para acelerar o processo de reparação óssea em tibia osteotomizada. No entanto, a diferença nos resultados que encontramos pode ser devido ao comprimento de onda usado, o modo utilizado (pulsado) e o tipo de osso estudado.

De acordo com a literatura, embora as terapias com laser de baixa intensidade pareçam melhorar os resultados clínicos em periodontia, quando houver a presença de tártaro, a raspagem e a profilaxia são as primeiras opções de tratamento. Só então, depois que o tecido periodontal estiver livre de cálculos a laser terapia pode ser usada como uma terapia auxiliar.

9 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, concluímos que a fotobiomodulação com o laser de 660nm, 10 J/cm²:

- não teve efeito significativo na densidade de leucócitos por cm² após as sessões de irradiações, nos levando a rejeitar a hipótese proposta,
- não teve efeito significativo na densidade de mastócitos, nos levando a rejeitar a hipótese proposta,
- Não teve efeito significativo na formação de fibras colágenas, nos levando a rejeitar a hipótese proposta,
- não teve efeito significativo sobre a profundidade de reabsorção óssea alveolar; nos levando a rejeitar a hipótese proposta.

REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, R.; VILLAVERDE, A.B.; AIMIRE, F.; BJORDAL, J.; BRUGNERA, A.; MITTMANN, J.; SILVA, J.A.; COSTA, M. Cytokine mRNA expression. Is decreased in the sub-plantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. **Photomed Laser Surg.**, v. 26, n. 1, 19-24, 2008.
- ALEO, J.J.; DE RENZIS, F.A.; FARBER, P.A.; VARBONCOEUR, A.P. The presence and biologic activity of cementum-bound endotoxin. **J. Periodontol.**, v. 45, p.672-675, 1974. PMID:4529435. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.1974.45.9.672>.
- BASSO, F.G.; PANSANI, T.N.; TURRIONI, A.P.; BAGNATO, V.S.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C.A. *In vitro* wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. **Int. J. Ent.**, 719452, 2012.
- BECK, J.D.; OFFENBACHER, S. Oral health and systemic disease: periodontitis and cardiovascular disease. **J. Dent. Educ.**, v. 62, n. 10, p. 859-870, 1998.
- BERBERT, F.L.; SIVIERI-ARAÚJO, G.; RAMALHO, L.T.; PEREIRA, S.A.; RODRIGUES, D.B.; DE ARAÚJO, M.S. Quantification of fibrosis and mast cells in the tissue response of endodontic sealer irradiated by low-level laser therapy. **Lasers Med. Sci.**, v. 26, n. 6, p. 741-747, 2011.
- CARUSO, U.; NASTRIL, L.; PICCOLOMINI, R.; D'ERCOLE, S.; MAZZA, C.; GUIDA, L. Use of diode laser 980 nm as adjunctive therapy in the treatment of chronic periodontitis. A randomized controlled clinical trial. **New Microbiol.**, v. 31, n. 4, p. 513-518, 2008.
- CARVALHO, D.C.L. **Ação do ultra-som de baixa intensidade em ossos de ratas osteopênicas [dissertação]**. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo; 2001.
- CARVALHO, A.L.; NAPIMOGA, M.H.; COELHO-CAMPOS, J.; SILVA-FILHO, V.J.; THEDEI Jr, 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. 735-740, 2011.
- CHOI, B.K.; MOON, S.Y.; CHA, J.H.; KIM, K.W.; YOO, Y.J. Prostaglandin E2 is a main mediator in receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand-dependent osteoclastogenesis induced by *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Treponema socranskii*. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 5, p. 813-820, 2005.

CHRISTODOULOU, C.; CHOY, E.H. Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis. **Clin. Exp. Med.**, v. 6, p. 13-19, 2006.

OLIVEIRA, R.F.; PIRES OLIVEIRA, D.A.; MONTEIRO, W. Comparison between the effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation *in vitro*. **Photomed. Laser Surg.**, v. 26, p. 6-9, 2008.

DE PAULA EDUARDO. C.; DE FREITAS. P.M.; ESTEVES-OLIVEIRA. M.; ARANHA. A.C.; RAMALHO. K.M.; SIMÕES. A.; STELLA. M. Laser phototherapy in the treatment of periodontal disease. **Lasers Med. Sci.**, v. 25, p. 6-12, 2010.

FUCHS, T. A.; ABED, U.; GOOSMANN, C.; HURWITZ, R.; SCHULZE, I.; WAHN, V. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **J. Cell Biol.**, v. 176, p. 231-241, 2007.

GARCIA, V.G.; FERNANDES, L.A.; DE ALMEIDA, J.M.; BOSCO A.F.; NAGATA, M.J.; MARTINS, T.M.; OKAMOTO, T, THEODORO, I.H. Comparison between laser therapy and non-surgical therapy for periodontitis in rats treated with dexamethasone. **Lasers Med. Sci.**, v. 25, n. 2, p. 197-206, 2010.

GONZAGA M.A.R. CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE RL, BARRETO A.L.S, DE OLIVEIRA V.G.M. SANTOS T.B. FREITAS DANTAS CD. Morphological analysis of second intention wound healing in rats submitted to 16 J/cm² lambda 660-nm laser irradiation. **Indian J. Dent. Res.**, v. 20, n. 3, p. 390, 2009.

HARRIS F, CHATFIELD LK, PHOENIX DA Phenothiazinium based photosensitisers photodynamic agents with a multiplicity of cellular targets and clinical applications. **Curr Drug Targets**, v. 6, n. 5, p. 615-627, 2005.

JENSEN, L.E. Targeting the IL-1 family members in skin inflammation. **Curr. Opin. Investig. Drugs**. v. 11, n. 11, p. 1211-1220, 2010.

KARU, T. **Low power laser therapy, biomedical photonics handbook**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2003, LLC. Chapter 48.

LEVY, B.M. Animal model of human disease: chronic destructive periodontitis periodontal disease, pyorrhea alveolaris, pyorrhea. Dental Science Institute, University of Texas. **Dental Branch**, v. 83, n. 3. 1976.

LIRANI-GALVAO, A.P.; JORGETTI, V.; DA SILVA, O.L. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. **Photomed Laser Surg.**, v. 24, n. 6, p. 735-740, 2006.

LUI, J.; CORBET, E.F.; JIN, L. Combined photodynamic and low-level laser therapies as an adjunctive nonsurgical treatment of chronic periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 46, n. 1, p. 89-96, 2011.

MÂRȚU, S.; AMĂLINEI, C.; TATARCIUC, M.; ROTARU, M.; POTĂRNICHIE, O.; LILIAȘ, O.; IRINA-DRAGA C. Healing process and laser therapy in the superficial periodontium: a histological study. **Rom. J. Morphol. Embryol.**, v. 53, n. 1, p. 111-116, 2012.

NISHIOKA, M.A.; PINFILDI, C.E.; SHELIGA, T.R.; ARIAS, V.E.; GOMES, H.C.; FERREIRA, L.M. LED (660 nm) and laser (670 nm) use on skin flap viability: angiogenesis and mast cells on transition line. **Lasers Med. Sci.**, v. 27, n. 5, p. 1045-1050, 2012.

- PENDYALA, G.; THOMAS. B.; JOSHI. S.R. Evaluation of total antioxidant capacity of saliva in type 2 diabetic patients with and without periodontal disease: a case-control study. **N. Am. J. Med. Sci.**, v. 5, n. 1, p. 51-57, 2013.
- PEPLOW, P.V.; CHUNG, T.Y.; BAXTER, G.D. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. **Photomed Laser Surg.**, v. 28, Suppl. 1, p.S3-40, 2010.
- PINHEIRO, A.L.; MEIRELES, G.C.; CARVALHO, C.M.; RAMALHO, L.M.; DOS SANTOS, J.N. Biomodulative effects of visible and undernourished wistar rats. **Photomed Laser Surg.**, v. 27, n. 6, p. 947-957, 2009.
- QUIRK, B.J., AND WHELAN, H.T. Near-infrared irradiation photobiomodulation: the need for basic science. **Photomed. Laser Surg.**, v. 29, n. 3, p. 143-144, 2011.
- RICCIONI, G.; ZANASI, A.; VITULANO, N.; MANCINI, D'ORAZIO, N. Leukotrienes in atherosclerosis: new target insights and future therapy perspectives. **Mediators Inflamm.**, v. 26, n.1, p. ,2009.
- SAGE, P.T.; CARMAN, C.V. Settings and mechanisms for trans-cellular diapedesis. **Front Biosci.**, v. 01 n. 14, p. 75-83, 2009.
- SHARMAN, W.M.; ALLEN, C.M.; VAN LIER, J.E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discov. Today**, v. 4, n, 11, p. 507-517, 1999.
- SRINIVAS, S.K.; PARRY. P. Periodontal disease and pregnancy outcomes: time to move on?. **MSCE, M.D. J. Womens Health (Larchmt)**. v. 21, n. 2, p. 121-125, 2012.
- SAWASAKI, I.; GERALDO-MARTINS, V.R.; RIBEIRO, M.S.; MARQUES, M.M. Effect of low-intensity laser therapy on mast cell degranulation in human oral mucosa. **Lasers Med. Sci.**, v. 24, n. 1, p. 113-116, 2009.
- SGOLASTRA, F.; PETRUCCI, A.; GATTO, R.; MONACO, A. Efficacy of er: Yag laser in the treatment of chronic periodontitis: systematic review and meta-analysis. **Laser Med Science. Lasers Med. Sci.**, v. 27, n. 3, p. 661-673, 2012.
- SHAHARRA, S.; PROUDFOOT, A.E.; PARK, C.C.; VOLIN, M.V.; HAINES, G.K. Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 ameliorates rat adjuvant-induced arthritis. **J. Immunol.**, v. 180, p. 3447-3456, 2008.
- SILVEIRA, L.B.; PRATES, R.A.; NOVELLI, M.D.; MARIGO, H.A.; GARROCHO, A.A.; AMORIM, J.C.; SOUSA, G.R.; PINOTTI, M.; RIBEIRO, M.S. Investigation of mast cells in human gingiva following low-intensity laser irradiation. **Photomed Laser Surg.**, v. 26, n. 4, p. 315-321, 2008.
- SUDA, T., N. TAKAHASHI, AND T.J. MARTIN. Modulation of osteoclast differentiation. **Endocr. Rev.**, v. 13, p. 66-80, 1992.
- TUGAL-TUTKUN, I.; HERBORT, C.P. Laser flare photometry: a noninvasive, objective, and quantitative method to measure intraocular inflammation. **Int. Ophthalmol.**, v. 30, n. 5, p. 453-464, 2010.
- VON KOCKRITZ-BLICKWEDE, M.; GOLDMANN, O.; THULIN, P.; HEINEMANN, K. NORRBY-TEGLUND, A.; ROHDE, M. Phagocytosis independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. **Blood**, v. 111, p. 3070-3080, 2008.

WHELAN H.T.; BUCHMANN E.V.; DHOKALIA, A. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 21, p. 67-74, 2003.

WHELAN, H.; DESMET, K.; BUCHMANN, E. Harnessing the cell's own ability to repair and prevent neurodegenerative disease. **SPIE Newsroom.**, v. 24, n. ____, p. ____, 2008.

YILMAZ, S.; KURU, B.; KURU, L.; NOYAN, U.; ARGUN, D.; KADIR, T. Effect of galium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. **Lasers Surg. Med.**, v. 30, p. 60-66, 2002.

**ANEXO – Aprovação pelo Comitê de Ética em
Experimentação Animal**

APÊNDICE – Artigo publicado