

LAMIS MEORIN NOGUEIRA

**ANÁLISE HISTOMÉTRICA DO PROCESSO DE REPARO DO REIMPLANTE
DENTÁRIO IMEDIATO SUBMETIDO À TERAPIA COM LASER DE BAIXA
INTENSIDADE. ESTUDO EM RATOS**

ARAÇATUBA-SP

2015

LAMIS MEORIN NOGUEIRA

ANÁLISE HISTOMÉTRICA DO PROCESSO DE REPARO DO REIMPLANTE DENTÁRIO IMEDIATO SUBMETIDO À TERAPIA COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE. ESTUDO EM RATOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientador: Prof. Dr. Celso Koogi Sonoda

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Leticia Helena Theodoro

ARAÇATUBA-SP

2015

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

N778e Nogueira, Lamis Meorin.
Análise Histométrica do processo de reparo do implante dentário submetidos à terapia com laser de baixa intensidade. Estudo com ratos. / Lamis Meorin Nogueira. - Araçatuba, 2015
60 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Celso Koogi Sonoda
Orientadora: Profa. Letícia Helena Theodoro

1. Laser 2. Polpa dentária 3. Reimplante dentário
4. Ligamento periodontal I. T.

Black D7
CDD 617.64

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, por ter me posto no caminho que hoje me encontro, pelas pessoas que Ele colocou neste percurso e pela família a qual pertenço.

Aos meus pais, **Abrahão e Célia**, pela formação que me deram, pela dedicação com que me educaram, pelo investimento que em mim empenharam, por terem tornado minha formação profissional possível, pela compreensão durante esses quatro anos e, principalmente, pela confiança que em mim empregaram. Amo vocês.

Ao meu irmão e familiares, que me incentivam e me apóiam em todas as minhas escolhas de cada dia no decorrer da minha vida.

Aos meus amigos, aqueles que permaneceram e aos novos que conquistei durante esta minha jornada de formação profissional. Estas pessoas especiais que tanto contribuíram para o meu crescimento e que me ajudaram a lapidar a pessoa que sou hoje, agradeço de coração.

Ao **Vinicius**, que acompanhou de perto esta jornada, apoiando e ajudando em todos os momentos que precisei. Obrigada pela compreensão, auxílio e conselhos.

Ao meu Orientador, **Celso Koogi Sonoda**, pela oportunidade e confiança que me proporcionou ao participar de suas pesquisas. Agradeço por todo o ensinamento em mim investido.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, por ser o instrumento para a realização da minha formação.

A **CAPES e a CNPQ**, pelo fomento disponibilizado, o qual foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao **Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, representado por todos os professores e funcionários, pela oportunidade de cursar o mestrado e o doutorado e pelo convívio com tantas pessoas maravilhosas.

Ao **Departamento de Ciências Básicas** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, especialmente à disciplina de **Anatomia** por ter me dado a oportunidade de estágio e convivência tanto com os professores quanto com os alunos, estagiários e funcionários.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP**, lugar em que dei início à minha jornada na formação profissional, à todos os professores e funcionários com os quais tive contato. Em especial aos professores da disciplina de Cirurgia pelo ano de 2009, período em que realizei meu estágio de atualização, agradeço a oportunidade e atenção que me foi confiada.

RESUMO

Nogueira LM: Análise histométrica do Processo de Reparo de reimplante dentário imediato submetido à Terapia com Laser de Baixa Intensidade. Estudo em ratos. [Tese] Araçatuba: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP; 2015.

Para averiguar a influência da terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) no processo de reparo em reimplante dentário, 90 ratos divididos em 3 grupos de 30 animais tiveram o incisivo superior direito extraído. No grupo C o incisivo foi reimplantado sem intervenção adicional. Nos grupos L1 e L2, os dentes foram irradiados com laser diodo antes, no interior do alvéolo, e logo após o reimplante, na parte externa do alvéolo. Essa dose foi repetida as 24, 48 e 72 horas pós-operatórias no grupo L1 e as 48, 96 e 144 horas no grupo L2. Após períodos de 7, 14 e 30 dias, os animais foram sacrificados para análise histológica em hematoxilina e eosina e Picrosirius Red. Observamos valores menores de inflamação no ligamento periodontal no grupo L1 ($p < 0,05$) aos 7 dias. Maior extensão de ligamento periodontal reinserto, nos grupos L1 e L2, aos 7 e 14 dias. Maior extensão de tecido pulpar normal foi encontrada nos grupos L1 e L2 no período de 14 dias. Maior comprometimento pela reabsorção radicular foi observado no grupo C aos 30 dias. Pode-se concluir que a terapia com LLLT influenciou positivamente no reparo do ligamento periodontal e tecido pulpar do dente reimplantado.

Palavras-chaves: *Laser; polpa dentária; reimplante dentário; ligamento periodontal.*

ABSTRACT

Nogueira LM: Histometric analysis of tooth immediate replantation repair process submitted to Low Level Laser Therapy. Study in rats. [Thesis] Araçatuba – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP; 2015.

To investigate the influence of low intensity laser therapy (LLLT) in the repair process of dental reimplantation, 90 mice divided into 3 groups of 30 animals had the right upper incisor extracted. In group C the incisive was reimplanted without further intervention. In the groups L1 and L2, the teeth were irradiated with diode laser before, inside the socket, and after reimplantation, outside of the socket. This dose was repeated 24, 48 and 72 hours after surgery, the group L1 and 48, 96 and 144 hours in the L2 group. After periods of 7, 14 and 30 days, the animals were sacrificed for histological examination with hematoxylin and eosin and Picrosirius Red. We observed smaller values of inflammation in the periodontal ligament in the L1 group ($p < 0.05$) at 7 days. Increased length of periodontal ligament reinserted in the L1 and L2 groups at 7 and 14 days. Greater extent normal pulp tissue was found in the groups L1 and L2 within 14 days. Greater commitment by root resorption was observed in group C at 30 days. It can be concluded that LLLT therapy had a positive influence on the repair of the periodontal ligament and the pulp tissue reimplanted tooth.

Key-words: *Lasers; dental pulp; tooth replantation; periodontal ligament.*

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1	Luxação do incisivo superior direito	41
Figura 2	Extração do incisivo superior direito	41
Figura 3	Aplicação do LLLT ao longo do comprimento da parede alveolar	41
Figura 4	Fotomicrografias em campo claro de cortes longitudinais de incisivo superior de ratos corados em H.E. Manutenção do ligamento periodontal em todos os grupos, em todos os períodos. Redução da extensão do tecido pulpar nos períodos de 14 e 30 dias, substituído por dentina terciária ou áreas de necrose. Abreviaturas: PO: Tecido Pulpar, TN: Tecido pulpar necrosado TO: tecido ósseo alveolar, LP: ligamento periodontal, D: Dentina, Asterisco: Dentina terciária. Aumento: 20x.	42
Figura 5	Fotomicrografias em campo claro de cortes longitudinais de incisivo superior de ratos corados em H.E. Manutenção do ligamento periodontal nos três grupos, em todos os períodos. Período de 7 dias: Ligamento periodontal e infiltrado inflamatório no grupo Controle. Reinserção do ligamento periodontal no grupo L1. Áreas hialinas e ausência de reinserção do ligamento periodontal nos grupos Controle e L2. Períodos de 14 e 30 dias: Grupo Controle com áreas de reabsorção. Ligamento periodontal reinserido nos grupos L1 e L2. Abreviaturas: TO: Tecido ósseo alveolar, LP: ligamento periodontal, H: Área hialina, D: dentina, Asterisco: Dentina terciária, RI: Reabsorção inflamatória. Aumento: 200x.	43
Figura 6	Fotomicrografias em campo claro de cortes longitudinais de incisivo superior de ratos corados em H.E. com características histológicas da polpa e dentina aos 7, 14 e 30 dias. Período de 7 dias: Tecido conjuntivo frouxo e camada de odontoblastos formando tecido pulpar normal (PO) presente nos três grupos. Períodos de 14 e 30 dias: Remanescentes de fibras colágenas e restos celulares formando o tecido pulpar necrosado, encontrado no grupo Controle. Aspecto da dentina terciária ocupando o espaço do tecido pulpar, nos grupos L1 e L2. Abreviaturas: D: dentina, Asterisco: Dentina terciária. PO: tecido pulpar, OD: Odontoblastos, TN: Tecido pulpar necrosado, LP: Ligamento periodontal, TO: Tecido ósseo alveolar. Aumento: 200x.	44
Figura 7	Birrefringência das fibras coradas com Picrosirius Red	45
Tabela 1	Frequência dos escores entre os grupos em relação à extensão e intensidade do processo inflamatório no ligamento periodontal, no período de 7 dias.	46
Tabela 2	Média em porcentagem e desvio padrão das áreas de Ligamento periodontal (LP) Ligamento periodontal reinserido (LPR) e áreas hialinas (H) nos grupos estudados, no período de 7 dias.	46
Tabela 3	Frequência dos escores entre os grupos em relação à extensão e intensidade do processo inflamatório no ligamento periodontal, no período de 14 dias.	46
Tabela 4	Média em porcentagem e desvio padrão da ocorrência de reabsorção inflamatória (R. Inf.), das áreas de Ligamento periodontal (LP) e Ligamento periodontal reinserido (LPR) nos grupos estudados no período de 14 dias.	47

Tabela 5	Média em porcentagem e desvio padrão da extensão do tecido pulpar entre os diferentes períodos no mesmo grupo.	47
Tabela 6	Média em porcentagem e desvio padrão da ocorrência de reabsorção inflamatória (R. Inf.), das áreas de Ligamento periodontal (LP) e Ligamento periodontal reinsertado (LPR) nos grupos estudados no período de 30 dias.	47
Tabela 7	Frequência dos escores entre os grupos em relação à extensão e intensidade do processo inflamatório no ligamento periodontal, no período de 30 dias. período.	48
Tabela 8	Média em porcentagem e desvio padrão da extensão de tecido pulpar em cada	48
Gráfico 1	Birrefringência das fibras do ligamento periodontal para espectro de cor verde	48
Gráfico 2	Birrefringência das fibras do ligamento periodontal para espectro de cor amarela	49
Gráfico 3	Birrefringência das fibras do ligamento periodontal para espectro de cor vermelha	49
Gráfico 4	Média da quantidade de fibras birrefringentes do ligamento periodontal em cada grupo estudado	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LLLT	Terapia de Laser de baixa frequência (Low-Level Laser Therapy)
g	Grama
UNESP	Universidade estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
mg	Miligrama
Kg	Kilograma
C	Controle
L1	laser em dias seguidos
L2	laser em dias alternados
GaAlAs	Gálio-alumínio-arsênio
Nm	Nanômetro
J/cm ²	joules por centímetros quadrados (densidade de energia – Energia (J) / área de irradiação (cm ²))
nW	Nanowatt
n°	Número
UI	unidades internacionais
mL	Mililitro
%	Porcentagem
PB	fosfato de sódio
M	Mol
pH	potencial hidrogênio
°C	grau celsius
µm	Micrômetro
X	Vezes
FOB	faculdade de odontologia de Bauru
USP	Universidade de São Paulo
°	Grau
TIFF	tagged image file format
RGB	red green blue
<	Menor

SUMÁRIO

Introdução	11
Proposição	14
Materiais e Métodos	15
Resultados	21
Discussão	28
Conclusão	35
Referências	36
Anexos	
Anexo I – Comitê de Ética	40
Anexo II – Materiais e Métodos	41
Anexo III – Imagens	42
Anexo IV – Tabelas e Gráficos	46
Anexo V – Normas para publicação	51

INTRODUÇÃO

Acidentes envolvendo dentes vão desde pequenas fraturas dentárias até o deslocamento total do dente para fora do seu alvéolo [1], causando rompimento das fibras do ligamento periodontal e do feixe vâsculo-nervoso, por isso é comum observar nestes casos danos ao ligamento periodontal e necrose pulpar. Em adição, devido ao esmagamento do dente em direção ao alvéolo, injúrias em pequenas áreas do cemento ocorrem [2].

Enquanto fora do alvéolo, o tecido pulpar é extremamente suscetível à contaminação bacteriana. Se a revascularização pulpar não ocorrer ou não for realizado um tratamento endodôntico eficiente, a câmara pulpar irá, inevitavelmente, infectar [2]. A combinação de bactéria no canal radicular e o dano ao cemento na superfície externa radicular resultam em uma reabsorção inflamatória externa, que pode levar a uma rápida perda do elemento dentário [3].

Quando um tecido é lacerado devido a um trauma, uma sequência de eventos acontece para reparar tal tecido. Embora o processo de reparo seja basicamente o mesmo em qualquer parte do corpo, ele pode variar em alguns aspectos dependendo dos tecidos envolvidos. Traumatismos dentários são lesões particularmente complexas devido à multiplicidade de tecidos e estruturas que podem ser afetadas [4, 5].

Reimplantar o dente é o tratamento de escolha [1, 4], seguido de acompanhamento para se observar a ocorrência de revascularização pulpar nos casos de rizogênese incompleta ou realizar o tratamento endodôntico em dentes com rizogênese completa, para que a manutenção do dente natural possa ser atingida [2, 5]. O prognóstico de um dente reimplantado depende das medidas tomadas no local do acidente ou do período imediatamente após a avulsão. [1]

O prognóstico da maioria dos dentes reimplantados é duvidoso devido à reabsorção radicular externa [2, 6]. Assim, várias estratégias tem buscado a melhora desse prognóstico por meio de novas formas de favorecer o reparo do ligamento periodontal [5, 7-9].

O objetivo do processo de reparo após um trauma é reestabelecer a continuidade entre as margens e reestabelecer a função do tecido [5]. Pesquisas no campo da saúde mostram que efeitos terapêuticos podem ser obtidos com Laser de baixa frequência (Low-Level Laser Therapy – LLLT), como um processo de reparo mais rápido, reparo ósseo, controle da inflamação e alívio da dor pela indução de reações biomecânicas, sem a produção de efeitos térmicos significantes [10, 11].

A aplicação de LLLT na medicina foi introduzida na década de 1970 e 1980. Desde então, consideráveis trabalhos científicos, incluindo o uso de culturas de células, modelos animais e estudos clínicos, foram realizados para avaliar os seus efeitos potencialmente benéficos. A aplicação de LLLT tornou-se popular em uma variedade de aplicações clínicas, incluindo o reparo de feridas e redução da dor [10].

LLLT não envolve interação térmica. Ao invés disso, a energia dos fótons causa efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos nas células e tecidos. Estudos demonstram que os efeitos dos Lasers de baixa frequência nos tecidos biológicos são processados de diversas maneiras, através da atividade mitótica de indução de células epiteliais, modificação da densidade capilar, estimulação da microcirculação local e aumento da síntese colágena tanto *in vitro* quanto *in vivo* [12-15].

Os poucos estudos sobre o uso do LLLT em reimplante dentário, apresentam diferentes resultados. Para Saito et al. [16] o uso do LLLT não proporcionou diferenças nos casos de reimplante dentário imediato e tardio quanto à ocorrência de reabsorção radicular e reparo do ligamento periodontal. Em outros estudos, é descrito uma redução nos índices de reabsorção radicular [17, 18], e nas áreas com necrose e inflamação do tecido pulpar [17], no entanto sem analisar o reparo do ligamento periodontal. Essas evidências demonstram que ainda existem dúvidas sobre o reparo de um dente reimplantado submetido à terapia com laser.

Para Saito et al. [16] parâmetros como comprimento de onda, potencia de saída, forma e número de aplicações, área irradiada, energia, tempo de irradiação e densidade de energia podem influir nos resultados. Assim, achamos oportuno o desenvolvimento deste estudo, sobre os efeitos do laser no processo de reparo do reimplante dentário em ratos. Aumentando o período de aplicação e a densidade de energia, este estudo se propôs a analisar a ocorrência de reabsorção radicular, reparo do tecido pulpar e do ligamento periodontal, elementos que influenciam diretamente no prognóstico um dente reimplantado.

PROPOSIÇÃO

O propósito deste estudo foi analisar a influência do laser de baixa potência no processo de reparo do reimplante imediato de incisivo superior de ratos. Verificar se o seu uso do laser antes e após o reimplante, com diferentes intervalos de aplicação, além de uma densidade de energia maior a encontrada na literatura, pode influir no reparo do ligamento periodontal e do tecido pulpar.

MATERIAIS E MÉTODOS

Previamente a sua realização a metodologia foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Protocolo 00250-2012) (Anexo I).

Para a realização deste trabalho foi utilizado o incisivo superior direito de 90 ratos (*Rattus albinus*, *Wistar*) machos com peso corporal entre 200 e 300 gramas, adquiridos e mantidos no biotério da faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os animais foram divididos em 3 grupos com 30 animais cada, sendo que no Grupo C (controle) não foi empregada a terapia com Laser. Nos Grupos L1 e L2 a terapia com Laser foi empregada em intervalos diferentes.

Antes e após o procedimento cirúrgico os animais receberam ração sólida (Ração Ativada Produtor-Anderson & Clayton S. A.) e água *ad libitum*. Nos períodos de jejum (14-16 horas) que antecederam o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos apenas com água.

- Procedimento cirúrgico

Para o procedimento cirúrgico nos animais, foi administrado por via intramuscular Cloridrato de Xilazina (Coopazine – Coopers Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil) e Cloridrato de Cetamina (Vetaset - Fort Dodge, São Paulo, SP, Brasil) nas dosagens de 10mg e 70mg para cada Kg de peso corporal, respectivamente, para a obtenção do efeito anestésico. Uma vez imobilizado o animal, foi realizada a anti-sepsia da porção anterior da maxila com PVPI (Riodeine – Ind. Farmac Rioquímica Ltda), sindesmotomia, luxação e extração do incisivo superior direito com auxílio de instrumental especialmente adaptado (Fig. 1 e 2). Os dentes extraídos foram então reimplantados em seus alvéolos de origem, realizando-se previamente a irrigação desses alvéolos com soro fisiológico (Ariston Indústria Química e Farmacêutica LTDA, São Paulo, Brasil).

No grupo C foi realizado o reimplante imediato sem qualquer intervenção adicional. No grupo L1, antes do reimplante, o interior do alvéolo foi irradiado com laser de diodo de baixa intensidade. Essa irradiação foi repetida nos períodos pós-operatórios de 24, 48 e 72 horas. No grupo L2, os mesmos procedimentos foram realizados sendo os períodos de irradiação aos 48, 96 e 144 horas pós-operatórios. Para a irradiação com o laser nos períodos pós-operatórios foi administrado por via intramuscular Cloridrato de Ketamina (Coopazine – Coopers Ltda, Cotia, SP, Brazil) na dosagem de 70mg por Kg de peso corporal, para imobilização do animal.

O laser de baixa potência empregado foi o de Gálio-Alumínio-Arsênio (GaAlAs) com comprimento de onda de 830 nm e área de spot de 0,028 cm² (TheraLaser® - DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, São Paulo, Brasil), com potência de saída de 40 mW e intensidade de potência de 1,42 W/cm². A irradiação dos tecidos foi realizada de forma pontual com a fibra posicionada na entrada do alvéolo (1/3 cervical), quando irradiado antes do reimplante, e perpendicularmente e em contato à superfície da mucosa oral, quando irradiada após o reimplante, ao longo do comprimento da parede alveolar distal em 2 pontos (terço médio e apical, este situado próximo ao primeiro molar superior), durante 99 segundos/ponto, com energia pontual de 3,98 J e densidade energética de 140 J/cm² (Fig. 3).

Após o reimplante, todos os animais receberam dose única de 20.000 UI de penicilina G benzatina (Fontoura Weyth) por via intramuscular.

- Eutanásia e preparação das peças para análise

Decorridos 7, 14 e 30 dias do ato operatório, os animais foram sacrificados por meio da perfusão transcardíaca. Para isso os animais foram novamente anestesiados com solução de xilazina e ketamina, para obtenção do acesso

cirúrgico ao coração e artéria aorta. Foi realizada a injeção intraventricular de heparina (0,1 ml / 5.000 U.I/ml) e após 10 segundos a perfusão via aorta, com solução salina a 0,9% (100ml), seguido de solução fixadora (400 ml) de paraformaldeído (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 4% em tampão fosfato de sódio (PB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 0,1 M, pH 7,4 a 4°C. A maxila direita foi separada da esquerda na linha mediana com emprego de lâmina de bisturi nº 15 (Embramac Exp e Imp.). Os espécimes assim obtidos foram fixados em solução de formalina a 10% por 24 horas e descalcificados em solução de EDTA a 4,13% pH 7,0.

Após a descalcificação as peças foram processadas e incluídas em parafina. Nos blocos foram realizados cortes semi-seriados de 6 µm de espessura, no sentido longitudinal da raiz. Foram selecionadas 4 lâminas para cada espécime contendo quatro cortes cada, os quais foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina, para análise histológica e morfométrica.

- Análise Histológica

A análise histológica foi realizada com auxílio de microscópio óptico (Axiolab – Zeiss, Alemanha), como somente a face lingual da raiz possui ligamento periodontal, somente ela foi considerada. Foram analisadas as características do ligamento periodontal, polpa, osso alveolar, cemento e dentina, além da ocorrência de reabsorção radicular ao longo de toda superfície radicular.

- Análise Histométrica

O corte longitudinal foi capturado por meio de uma câmera Axio Cam MRc5 (Carl Zeiss do Brasil LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) acoplada a um Estereomicroscópio Stemi 2000C (Carl Zeiss do Brasil LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) com um aumento de 1:25 que permitiu uma visão panorâmica do dente. Essa imagem foi salva como figura no programa Axio Vision 4.5 (Carl Zeiss do

Brasil LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) e utilizada para a quantificação no programa Image J (Wayne Rasband - Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland).

Inicialmente foi mensurada a área total de dentina radicular e em seguida a área de dentina radicular reabsorvida. O valor da área de dentina total e da área de dentina reabsorvida foi submetido a uma regra de três para quantificar a porcentagem de raiz comprometida pela reabsorção. Para a identificação e seleção das áreas de reabsorção, as imagens digitais obtidas foram comparadas com os cortes histológicos no microscópio.

Na análise da polpa, foi mensurada a área de toda extensão do dente e depois a extensão do tecido pulpar em condição de integridade existente no conduto radicular. A partir de uma regra de três, foi obtido o percentual de tecido pulpar de cada espécime. A partir destes valores foram calculadas as médias de cada grupo e aplicado o teste estatístico.

As áreas de ligamento periodontal, ligamento periodontal reinserido e as áreas hialinas foram mensuradas por meio do perímetro, sendo inicialmente mensurado o perímetro total da raiz e depois o perímetro onde foram encontrados os eventos histológicos em análise. Da mesma forma que para a reabsorção, a porcentagem foi obtida por meio da regra de três.

No ligamento periodontal, foram analisados a extensão e a intensidade do processo inflamatório agudo. Para isso foram utilizados escores que variavam de 1 a 4, baseado no critério de Wolfson e Seltzer [19]. Assim, para a extensão do infiltrado de células inflamatórias:

1- Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias;

2- Processo inflamatório presente apenas no ligamento periodontal apical ou coronário ou pequena área lateral;

3- Processo inflamatório atingindo mais que a metade do ligamento periodontal lateral da raiz do dente;

4- Processo inflamatório em todo ligamento periodontal.

Para a intensidade do processo inflamatório o critério foi:

1- Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias;

2- Leve: menos de 10 células por campo com aumento de 400x;

3- Moderado: entre 10 e 25 células por campo com aumento de 400x;

4- Severo: mais de 25 células por campo com aumento de 400x.

- Análise Picro Sirius

Para este experimento, os cortes histológicos de todos os períodos, foram corados com solução de Picrosirius Red e contra corados com Hematoxilina de Harris. Os cortes foram todos corados na mesma etapa para evitar quaisquer variações de cor entre as amostras por possíveis diferenças na impregnação do corante.

A intensidade da birrefringência das fibras colágenas promovida pelo Picrosirius Red, foi emitida através de uma lente polarizadora acoplada a um microscópio invertido binocular Leica® (DM IRB/E) do Centro Integrado de Pesquisa da FOB/USP. Foram capturadas imagens, em objetiva de 10x, a qual permitiu uma visualização adequada das fibras colágenas, desde as mais finas (emitindo birrefringência na tonalidade verde) até as mais espessas (emitindo birrefringência na tonalidade amarela e vermelha). Uma vez definida uma quantidade ótima de luz no microscópio óptico para visualização das fibras, e o ângulo da lente polarizadora (90° em relação à fonte de luz do microscópio), todas as imagens foram capturadas com o mesmo parâmetro e salvas em arquivo do formato TIFF, em alta resolução (1396 x 1626 pixels).

Foram avaliados pelo menos 4 cortes histológicos para cada animal, sendo capturada uma imagem para cada corte contendo todo campo de interesse. A quantificação da intensidade do brilho de birrefringência foi realizada utilizando o Software KS 300/400 com AxioVision (versão 4.8, CarlZeiss). Inicialmente foram definidos os espectros para cor verde, amarela e vermelha, seguindo valores de RGB (Red, Green e Blue), os quais foram padronizados para todas as imagens. As fibras birrefringentes dentro do espectro de cor verde foram relacionadas a uma matriz menos organizada e mais imatura, inversamente fibras com espectro de cor variando do amarelo para o vermelho foram relacionadas a uma matriz com maior grau de organização e maturação.

Para a quantificação, as imagens foram binarizadas para cada espectro de cor, e a quantidade em pixels de cada cor correspondente à área total delimitada foi mensurada pelo software. Posteriormente, foram calculadas as médias dos valores em pixels dos 4 cortes de cada animal.

- Análise Estatística:

Os valores obtidos foram submetidos à análise estatística, cujos cálculos foram realizados pelo software GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Softwares Incorporated, San Diego, USA). Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade. Como os valores se mostraram não normais, o teste de Kruskal-Wallis, para comparações múltiplas de dados não-paramétricos, foi utilizado para comparação das amostras com nível de significância $p < 5\%$. Quando evidenciada diferença estatisticamente significativa, o teste de Dunn foi utilizado para comparações individuais.

RESULTADOS

Análise histológica: Alguns espécimes foram desconsiderados na análise por conta da ocorrência de fratura da coroa ou da raiz durante o procedimento de exodontia e reimplante.

Grupos C, L1 e L2 (Período de 7 dias): Os dentes analisados apresentaram integridade em quase toda extensão da superfície radicular em todos os grupos. A reabsorção radicular se caracterizou por poucos e pequenos pontos que envolviam apenas a camada mais superficial da raiz. O ligamento periodontal foi observado na quase totalidade da superfície radicular de todos os espécimes (Fig. 4). Com exceção de 2 espécimes do grupo C e 3 dos grupos L1 e L2, áreas hialinas ocupavam alguns espaços do ligamento periodontal (Fig. 5). Eram caracterizadas pela ausência de células e apresentavam aspecto eosinofílico.

O ligamento periodontal era formado por tecido conjuntivo fibroso que se caracterizava pela grande quantidade de fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos. Apresentava em algumas áreas, um infiltrado inflamatório composto principalmente por linfócitos, alguns histiócitos e raros neutrófilos. Na análise da extensão e intensidade do processo inflamatório, observou-se que o grupo C apresentou os maiores valores principalmente quando comparado ao grupo L1 (Tabela 1).

Áreas de reinserção das fibras colágenas foram encontradas em todos os espécimes, mas nos grupos L1 e L2 apresentaram valores superiores ao encontrado no grupo C (Tabela 2). Essas áreas se caracterizavam pela disposição perpendicular das fibras colágenas em relação à camada de cimento onde se inseriam (Fig. 5). Nesses locais a camada de cementoblastos era

observada ao longo da superfície cementária. Nas demais áreas, essas fibras se apresentavam desorganizadas ou dispostas paralelamente à superfície radicular.

A parede óssea alveolar apresentava intensa atividade osteoclástica, onde se observava a presença de clastos junto aos pontos de reabsorção. Áreas de tecido ósseo neoformado foram encontradas em vários pontos, com grande número de osteoblastos.

O tecido pulpar em condição de normalidade foi encontrado em todos os espécimes nos três grupos em extensão semelhante. Eram formadas por um tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado. Fibroblastos com formatos fusiformes e estrelados estavam distribuídos em uma abundante matriz extracelular. As fibras colágenas presentes na matriz extracelular eram delgadas e estavam dispostas de forma irregular (Fig. 6).

Recobrimo a parede do conduto radicular era possível observar a camada de odontoblastos, cujas células eram cilíndricas e alongadas, dispostas em maior número na porção mais coronária e em menor número e mais curtas na porção apical. Entre os odontoblastos e a dentina podia se observar a camada de predentina, formada por uma camada de tecido com coloração menos intensa. (Fig. 6). Áreas de necrose também foram encontradas e eram formadas por remanescentes de fibras colágenas e restos celulares, irregularmente dispostos em meio a um exsudato inflamatório. Nessas áreas os odontoblastos estavam ausentes (Fig. 6).

Grupos C, L1 e L2 (Período de 14 dias): Nesse período, o comprometimento pela reabsorção radicular foi observado em 6 espécimes do grupo C, em 2 espécimes do grupo L1 e em 3 espécimes do grupo L2. Envolviam pequena profundidade e extensão da superfície radicular e se caracterizavam por

apresentar um infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo fibroso junto à área reabsorvida (Fig. 5). Em alguns casos, clastos eram encontrados junto à dentina reabsorvida, indicando a fase ativa da reabsorção inflamatória.

A presença de ligamento periodontal na maior parte da superfície radicular de todos os grupos observada no período anterior, se manteve neste período (Fig. 4). Um infiltrado inflamatório que variou de leve a moderado, foi observado em todos os grupos, sendo semelhantes em extensão e intensidade (Tabela 3). Houve um aumento na extensão do ligamento periodontal que apresentava características de reinserção em todos os grupos, porém, a superioridade encontrada nos grupos L1 e L2 em relação ao grupo C, se manteve (Fig. 5) (Tabela 4). O tecido ósseo alveolar apresentou características semelhantes ao período anterior em todos os grupos, sendo menos frequentes os pontos de reabsorção.

As áreas de tecido pulpar em condição de normalidade mantiveram valores próximos ao período anterior nos grupos L1 e L2. Uma diminuição foi observada no grupo C, com aumento nas áreas de necrose e de dentina reparadora (Tabela 5). A dentina reparadora ocupava principalmente a porção mais coronária e apresentava túbulos dentinários irregularmente dispostos e em alguns casos, inclusões celulares (Fig. 6). Em 3 espécimes, também foram observadas na região apical pequenas formações de tecido osteóide.

Grupos C, L1 e L2 (Período de 30 dias): Áreas de reabsorção inflamatória foram encontradas em 6 espécimes do grupo C (Fig. 5), em 3 espécimes do grupo L1 e em 2 espécimes do grupo L2. Nos grupos L1 e L2 apresentaram valores próximos ao período anterior. Um aumento foi observado no grupo C que se mostrou superior ao do grupo L2 (Tabela 6).

Neste período, observou-se um aumento nas áreas de reinserção do ligamento periodontal no grupo C, enquanto nos grupos L1 e L2 os valores se mantiveram semelhantes (Tabela 6). As áreas de inflamação no ligamento periodontal se mostraram semelhantes entre os grupos, variando de leve a moderado (Tabela 7). Menos pontos de reabsorção foram encontrados na parede óssea alveolar, nesse período. Áreas de tecido ósseo neoformado aparecem em vários pontos.

Uma diminuição nas áreas de tecido pulpar foi observada nos três grupos, em relação ao período de 14 dias (Fig. 4 e 6). Essa redução foi significativa no grupo C em relação ao grupo L2 (Tabela 8). Substituindo o tecido pulpar, foi encontrado em 5 espécimes do grupo C, proporções semelhantes de necrose e de dentina terciária (Fig. 4 e 6). Em dois espécimes, predominou a dentina terciária. No grupo L1, 3 espécimes apresentaram mais áreas de necrose enquanto em outras 3 houve predomínio da dentina terciária. Em 2 espécimes houve proporções semelhantes. No grupo L2, em 2 espécimes, mais áreas de necrose foi encontrada e em 4, a dentina terciária ocupava a maior parte do conduto radicular. Em 2 espécimes houve proporções semelhantes. Em todos os espécimes pequenas formações de tecido osteóide ocupavam a porção mais apical.

Análise Picrosirius:

As imagens revelaram fibras colágenas birrefringentes nas tonalidades de cor verde, amarela e vermelha, representando qualitativamente diferentes estados de maturação das fibras ao longo dos períodos experimentais. (Fig. 7)

Grupos C, L1 e L2 (espectro de cor verde): no grupo C a quantidade de fibras apresentou-se maior nos períodos de 14 e 30 dias, quase não se alterando entre

eles, quando comparada com o período de 7 dias. Já no grupo L1 a quantidade de fibras com espectro para a cor verde apresentou leve alteração entre os períodos, sendo a quantidade maior no período de 14 dias, seguido pelo período de 7 dias e finalizando, com menor quantidade no período de 30 dias. Já o grupo L2 apresentou um decréscimo na quantidade de fibras do período de 7 dias para o período de 14 dias, sendo que aos 30 dias houve o reestabelecimento da quantidade inicial de fibras colágenas. (Gráfico 1)

Grupos C, L1 e L2 (espectro de cor amarelo): o grupo C apresentou uma curva ascendente nos períodos observados, revelando uma maior quantidade de fibras com birrefringência para o espectro de cor amarela no período de 30 dias. No grupo L1 ocorreu o oposto, uma curva descendente, revelando uma quantidade maior de fibras no período de 7 dias, porém não uma curva acentuada como no grupo C. No grupo L2 esses números praticamente se mantiveram estáveis com uma variação discreta entre os períodos. (Gráfico 2)

Grupos C, L1 e L2 (espectro de cor vermelha): no grupo C, do mesmo modo que foi observado no espectro de luz amarelo, houve uma curva crescente, onde a maior quantidade de fibras evidenciadas foi no período de 30 dias. No grupo L1 observou-se uma manutenção do número de fibras nos períodos de 7 e 14 dias, evidenciando um aumento deste número no período de 30 dias. O grupo L2 apresentou uma curva decrescente, onde a maior quantidade de fibras com espectro para cor vermelha era no período de 7 dias. (Gráfico 3)

Foi possível observar também a média da quantidade de fibras birrefringentes que cada grupo apresentou, sendo que o grupo L1 manteve-se constante em todos os períodos, o grupo C apresentou uma curva ascendente e o

grupo L2 apresentou uma média maior aos 7 dias e uma média menor aos 14 dias. (Gráfico 4)

Não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos.

DISCUSSÃO

Nesse estudo, optou-se pelo reimplante imediato uma vez que o objetivo da análise seria a influência do laser no processo de reparo do ligamento periodontal e também do tecido pulpar com vitalidade.

Dentre os fatores que mais influenciam no prognóstico de um dente reimplantado, o período extrabucal e o meio de conservação são os mais significativos [1, 16, 20]. Assim, nos casos de reimplante dentário como o realizado nesse estudo é de se esperar que o ligamento periodontal encontre-se regenerado na maior parte da superfície radicular. No entanto, é importante que ocorra a reinserção das fibras colágenas na camada de cimento uma vez que essa é sua característica original.

De fato, observou-se que em todos os espécimes desse estudo, houve a manutenção de grande extensão de ligamento periodontal com vitalidade. Embora demonstrado na literatura de que o LLLT favorece a proliferação de fibroblastos [21], não se observou diferença significativa entre os grupos tratados ou não, quanto a extensão de ligamento periodontal com vitalidade nos períodos avaliados.

A esse respeito, dados da literatura demonstram que a proliferação do ligamento periodontal quando submetido à terapia com laser, ocorre nas primeiras 72 horas [10, 21]. Estudos histológicos em ratos demonstram também que esse tipo de animal possui um metabolismo acelerado quando comparado a outros animais e ao homem [22, 23], o que poderia indicar um reparo mais rápido. Assim, acreditamos que a constatação de possíveis diferenças poderia ser observada em período de análise inferior a 72 horas.

Na análise do reparo do ligamento periodontal, foram encontradas áreas hialinas na superfície radicular dos três grupos, no período de 7 dias. Também denominada de necrose estéril [24], essas áreas se caracterizam pela ausência das células, com predominância de matriz extracelular e remanescente de fibras colágenas. As células do ligamento periodontal seriam danificadas, sofreriam necrose, por conta do trauma mecânico e da hipóxia, ainda que momentânea, durante a exposição da raiz ao meio externo.

Habib et al. [24], observaram que o uso do laser promoveu uma diminuição significativa nas áreas hialinas comparando os períodos de 7 e 13 dias, em dentes submetidos à movimentação ortodôntica. No nosso estudo os valores encontrados no período de 7 dias indicam uma tendência à menor ocorrência dessas áreas nos grupos tratados com laser. No entanto a comparação entre os períodos não foi possível porque essas áreas não foram encontradas aos 14 dias. Segundo a literatura, isso ocorreria porque, uma vez cessada a causa que levou à sua formação, ocorreria o reparo [25]. Já no trabalho de Habib et al [24], a utilização de forças ortodônticas por períodos mais longos permitiria a observação das áreas hialinas também no período de 13 dias.

Na análise do processo inflamatório do ligamento periodontal, observou-se que no período de 7 dias, os índices encontrados no grupo L1 foram menores do que os observados no grupo C, tanto em extensão quanto em intensidade. Efeito anti-inflamatório com o uso do laser tem sido demonstrado em alguns estudos in vivo [21, 26]. No entanto essa mesma redução não foi observada no grupo L2, o que nos leva a crer que essa efetividade seria maior quando o laser é aplicado na fase inicial do reparo, quando a inflamação é mais significativa.

Pode-se observar também que as médias das áreas de reinserção do ligamento periodontal obtidas no período de 7 e 14 dias, foram maiores nos grupos tratados com laser. Esse resultado sugere que essa terapia pode modificar qualitativamente, o reparo do ligamento periodontal. A coloração com Picrosirius Red demonstrou que os níveis de cor vermelha e amarela, indicativos de fibras mais maduras, foram maiores nesses mesmos períodos também nos grupos tratados com laser. Isso poderia indicar que a recuperação dessas fibras já existentes, ocorreu de forma mais rápida.

Corroborando os achados deste estudo, Schwarz et al [27] demonstraram que o uso do LLLT favorece a aderência de fibroblastos, resultando em maior inserção de fibras colágenas na superfície radicular submetidas à raspagem. Em outro estudo observou-se que o LLLT favorecia a rápida remodelação do ligamento periodontal após tratamento ortodôntico em ratos [28]. Para os autores essa terapia aceleraria o processo de degradação e neoformação do colágeno durante a fase de remodelação, resultando em menor recidiva ao tratamento ortodôntico.

A reinserção das fibras colágenas indica um ligamento periodontal melhor estruturado e tem se constituído em aspecto de importância na análise do reparo em reimplante dentário [29, 30]. Nesse caso, suas fibras colágenas encontram-se inseridas na camada mineralizada do cimento formando as fibras de Sharpey. Tal estrutura exerce importante fator protetor da superfície radicular à reabsorção. As áreas da raiz com menor densidade dessa estrutura são mais susceptíveis à reabsorção [25]. É também entre as fibras colágenas, junto à camada de cimento, que se localizam os cementoblastos, que possuem papel fundamental na função de proteção à reabsorção [25].

Como observado em estudo prévio [31], a ocorrência de reabsorção radicular no período de 7 dias se restringiu a pequenos pontos geralmente envolvendo a camada de cimento ou a porção mais superficial da dentina. Sua quantificação foi possível somente nos períodos de 14 e 30 dias quando se apresentaram mais significativas. Nesse caso, no período de 30 dias, os grupos tratados com laser apresentaram média inferior ao grupo C, no entanto, somente o grupo L2 apresentou diferença significativa. Acreditamos assim, que a terapia com laser nos períodos mais tardios deste estudo tenha sido mais efetiva no controle da reabsorção radicular. Isso porque, os primeiros sinais de reabsorção radicular são observados a partir dos 7 dias após o reimplante, intensificando 14 dias depois [32].

Apesar de se tratar de reimplante imediato, a influência do trauma mecânico da exodontia, com lesão de algumas fibras colágenas, exposição ao meio bucal e contaminação podem levar em certo grau, à desvitalização de algumas áreas do ligamento periodontal e ocorrência de pequenas áreas de reabsorção [33]. Nesse estudo, as áreas de reabsorção encontradas foram exclusivamente do tipo inflamatória. Tal aspecto parece indicar uma ação anti-inflamatória do laser contribuindo para esse resultado [22, 26, 34]. Vilela et al., [17] também relacionaram a redução nas áreas de reabsorção à ação anti-inflamatória do laser. Para Carvalho et al. [18] que estudaram reimplante tardio, esse resultado seria consequente do efeito bactericida e da modificação estrutural da superfície radicular do dente reimplantado provocada pelo laser, tornando-a mais resistente à ação dos clastos.

Na tabela 8 observa-se que proporções semelhantes de tecido pulpar em condição de normalidade foram encontradas nos três grupos deste estudo no

período de 7 dias, indicando que houve revascularização. Segundo a literatura esta é uma condição com maior possibilidade de ocorrência em reimplante imediato de dentes com forame amplo [35]. No entanto, no período de 14 dias, observou-se uma diminuição na média dessa área somente no grupo C, sendo estatisticamente significativa quando comparado aos grupos L1 e L2. Analisado individualmente nota-se na tabela 5, que no grupo C, a redução da extensão do tecido pulpar ocorreu no período de 14 e 30 dias, sendo significativa já no período de 14 dias quando comparado ao período de 7 dias. Já nos grupos L1 e L2 isso ocorreu somente no período de 30 dias. A análise histológica demonstra que essa redução ocorreu principalmente por conta da formação de áreas de necrose e de dentina terciária.

As áreas de necrose seriam consequentes na falta de irrigação do tecido pulpar [17, 36] resultante do rompimento do feixe vâsculo-nervoso após o trauma. Estudos demonstram que o LLLT favorece a angiogênese [37, 38], acelera os eventos envolvidos no reparo [39] e controla a inflamação [21, 26]. Favorecendo a revascularização o tempo de hipóxia do tecido pulpar poderia ser minimizado, resultando em menos áreas de necrose.

Por sua vez, a formação de dentina terciária parece ser uma resposta dos odontoblastos à ação do trauma e resulta na diminuição da luz do canal [40, 41]. Na literatura, diferentes resultados sobre a ação do laser sobre a polpa são encontrados. Estudando o efeito do laser no desenvolvimento das raízes de molares de ratos com rizogênese incompleta, Toomarian et al., [42], observaram que a velocidade de formação da dentina na parede do conduto radicular, era maior nos dentes irradiados. Para os autores essa influencia se daria em parte pelo aumento na atividade da fosfatase alcalina, favorecendo a formação de tecido mineralizado.

Ferreira et al., [43] observaram após o uso do laser em cavidades de classe V de pre-molares de humanos que houve uma redução na inflamação e maior formação de dentina reacionária. Atribuíram esse resultado à formação de colágeno tipo III, fibronectina e tenascina, os quais participariam respectivamente, na formação da predentina, na formação e migração dos odontoblastos e por fim na capacidade de diferenciação dos fibroblastos para produzirem tecido calcificado. Por outro lado, Abi-Ramia et al [11] observaram a recuperação dos odontoblastos após terapia com LLLT de dentes submetidos à movimentação ortodôntica. Em dentes traumatizados, Vilela et al. [17] observaram que a terapia com laser promoveu menos inflamação e menos áreas de necrose na polpa.

Nesse estudo, de uma forma geral, não foi possível estabelecer uma relação específica com a ocorrência de necrose ou com a formação de dentina terciária como fator principal para a diminuição da extensão da polpa. Observa-se sim que a tendência à preservação desse tecido foi maior quando o laser foi empregado.

Ainda são escassos os dados sobre a forma de utilização do laser em reimplante dentário. Saito et al. [16] utilizaram laser de baixa potencia (GaAlAs, 830nm 57,14 j/cm²) no ligamento periodontal da parede interna do alvéolo por possuir maior poder de penetração. Utilizaram também o laser de luz visível (660nm 57,14j/cm²) no ligamento periodontal da superfície radicular por possuir menor poder de penetração e ser o mais indicado para lesões superficiais. Villela et al. [17] também utilizaram o laser de baixa potencia (InGaAl, 685nm, 50jcm²) no interior do alvéolo, antes do reimplante e imediatamente após, na entrada do alvéolo e na superfície lingual do dente reimplantado. Com o objetivo de promover uma modificação estrutural na superfície radicular, Carvalho et al. [18]

empregaram o laser diodo de alta potencia (GaAIAs, 810nm, 1.0W, 30s) em raízes de dentes com ligamento periodontal desvitalizado, antes do reimplante.

Nesse estudo empregou-se o laser diodo GaAIAs (comprimento de onda de 830nm) em função de seu maior poder de penetração em tecidos profundos [16, 44]. A radiação infravermelha possui baixo coeficiente de absorção pela água e pela hemoglobina, permitindo assim o alcance de tecidos mais profundos [42]. Como a aplicação seria feita externamente ao alvéolo, sobre a mucosa, optou-se por densidade energética maior (140 J/cm²) do que a utilizada por outros autores [16, 17], sendo aplicado em dois pontos (apical e médio da face distal) da raiz com o objetivo de abranger a maior parte do ligamento periodontal assim como da região apical. Buscando uma ação mais prolongada, optou-se por utilizá-lo por períodos de até 6 dias em intervalos diferentes para verificar sua efetividade no processo de reparo em diferentes fases. Os resultados deste estudo demonstraram características favoráveis para alguns dos aspectos histológicos analisados. No entanto, acreditamos ser importante a realização de outros estudos para se analisar a influência do laser com diferentes parâmetros, em outras condições de reimplante dentário.

CONCLUSÃO

Foi possível concluir deste estudo que a terapia com laser de baixa potência utilizado com diferentes intervalos de aplicação e com uma densidade de energia alta, pode influir positivamente no processo de reparo do reimplante imediato de incisivo superior de rato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Castilho LR, Sundefeld ML, de Andrade DF, Panzarini SR, Poi WR. Evaluation of sixth grade primary schoolchildren's knowledge about avulsion and dental reimplantation. 2009 Dent Traumatol. Aug;25(4):429-32.
2. Trope M. Clinical management of the avulsed tooth: present strategies and future directions. 2012 Dent Traumatol. Feb;18(1):1-11.
3. Tronstad L. Root resorption - etiology, terminology and clinical manifestations. 1988 Endod Dent Traumatol. Dec;4(6):241-52.
4. Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L. 2007 Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth, 4th ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 912p.
5. Panzarini SR, Okamoto R, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, da Silva PE, Saito CT, Marão HF, Sedlacek P. Histological and immunohistochemical analyses of the chronology of healing process after immediate tooth replantation in incisor rat teeth. 2013 Dent Traumatol. Feb;29(1):15-22.
6. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 1. Diagnosis of healing complications. 1995 Endod. Dent. Traumatol. Apr;11(2):51-58.
7. Filippi A, Pohl Y, von Arx T. Treatment of replacement resorption with Emdogain - a prospective clinical study. 2002 Dent Traumatol. Jun;18(3):138-43.
8. Loo WT, Dou YD, Chou WK, Wang M. Thymosin alpha 1 provides short-term and long-term benefits in the reimplantation of avulsed teeth: a double-blind randomized control pilot study. 2008 Am J Emerg Med. Jun;26(5):574-7.
9. Lam K, Sae-Lim V. The effect of Emdogain gel on periodontal healing in replanted monkeys' teeth. 2004 Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Jan;97(1):100-7.
10. Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, d'Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. 2003 J Clin Periodontol. Apr;30(4):353-8.

11. Abi-Ramia LB, Stuani AS, Stuani As, Stuani MB, Mendes Ade M. Effects of Low-Level Laser Therapy and Orthodontic Tooth Movement on Dental Pulp in Rats. 2010 *Angle Orthod.* Jan;80(1):116-22.
12. Cruaños JC, Villacampa XA. 1984 La terapia laser hoy. Centro Documentación láser de Meditec.
13. Conlan MJ, Rapley JW, Cob CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation A review. 1996 *J Clin Periodontol.* May;23(5):492–6.
14. Saperia D, Glassberg E, Lyons RF, Abergel RP, Baneux P, Castel JC, Dwyer RM, Uitto J. Demonstration of elevated type i and type iil procollagen mrna levels in cutaneous wounds treated with helium-neon laser. 1986 *Biochem Biophys Res Comum.* Aug;14;138(3):1123–8.
15. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser Photostimulation of Collagen Production in Healing Rabbit Achilles Tendons. 1998 *Lasers Surg Med.* 22(5):281-7
16. Saito CT, Guilineli JL, Panzarini SR, Garcia VG, Okamoto R, Sonoda CK, Poi WR. Effect of low-level laser therapy on the healing process after tooth replantation: a histomorphometrical and immunohistochemical analysis. 2011 *Dent Traumatol.* Feb;27(1):30-9.
17. Vilela RG, Gjerde K, Frigo L, Leal Junior ECP, Lopes-Martins RAB, Kleine BM, Prokopowitsc L. Histomorphometric analysis of inflammatory response and necrosis in re-implanted central incisor of rats treated with low-level laser therapy. 2012 *Lasers Med Sci.* May;27(3):551–557.
18. Carvalho ED, Costa FT, Campos MS, Anbinder AL, Neves AC, Habitante SM, Lage-Marques JL, Raldi DP. Root surface treatment using diode laser in delayed tooth replantation: radiographic and histomorphometric analyses in rats. 2012 *Dent Traumatol.* Dec;28(6):429-36.
19. Wolfson EM, Seltzer S. Reaction of rat connective tissue to some gutta-percha formulations. 1975 *J Endod.* Dec;1(12):395-402.
20. Andersson L, et. al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. 2012 *Dent Traumatol.* Apr;28(2):88-96.
21. Choi EJ, Yim JY, Koo KT, Seol YJ, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC, Chung CP, Kim TI. Biological effects of a semiconductor diode laser on human

- periodontal ligament fibroblasts. 2010 J Periodontal Implant Sci. Jun; 40(3):105-10.
22. Moretton TR, Brown CE Jr, Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. 2000 J Biomed Mater Res Dec;52(3):528–33.
23. Lustosa-Pereira AL, Garcia RB, Moraes IG, Bernardineli N, Bramante CM, Bortoluzzi EA. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rats' teeth. 2006 Dent Traumatol. 22:30–5.
24. Amorim JC, de Sousa GR, de Barros Silveira L, Prates RA, Pinotti M, Ribeiro MS. Clinical Study of the Gingiva Healing after Gingivectomy and Low-Level Laser Therapy. 2006 Photomed Laser Surg. Oct;24(5):588-94.
25. Habib FA, Gama SK, Ramalho LM, Cangussú MC, dos Santos Neto FP, Lacerda JA, de Araújo TM, Pinheiro AL. Effect of Laser Phototherapy on the Hyalinization Following Orthodontic Tooth Movement in Rats. 2012 Photomed laser Surg. Mar;30(3):179-85.
26. Consolaro A. 2005 Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. 2ª ed. Maringá, PR: Dental Press.
27. Schwarz F, Aoki A, Sculean A, Georg T, Scherbaum W, Becker J. In Vivo Effects of an Er:YAG Laser, an Ultrasonic System and Scaling and Root Planing on the Biocompatibility of Periodontally Diseased Root Surfaces in Cultures of Human PDL Fibroblasts. 2003 Lasers Surg Med. 33(2):140-7.
28. Kim SJ, Kang YG, Park JH, Kim EC, Park YG. Effects of low-intensity laser therapy on periodontal tissue remodeling during relapse and retention of orthodontically moved teeth. 2013 Lasers Med Sci. Jan;28(1):325-33.
29. Mori GG, Garcia RB, Gomes de Moraes I, Bramante CM, Bernardineli N. Morphometric and microscopic evaluation of the effect of a solution of alendronate as an intracanal therapeutic agent in rat teeth submitted to late reimplantation. 2007 Dent Traumatol. Aug;23(4):218–21.
30. Mori GG, Nunes DC, Castilho LR, de Moraes IG, Poi WR. Propolis as storage media for avulsed teeth: microscopic and morphometric analysis in rats. 2010 Dent Traumatol. Feb;26(1):80-5.

31. Panzarini SR, Nonato CC, Gulinelli JL, Poi WR, Sonoda CK, Saito CT, Marão HF. Effect of the treatment of root surface-adhered necrotic periodontal ligament with propolis or fluoride in delayed rat tooth replantation. 2014 Clin Oral Investig. May;18(4):1329-33.
32. Andreasen JO. Analysis of pathogenesis and topography of replacement root resorption (ankylosis) after replantation of mature permanent incisors in monkeys. 1980 Swed Dent J. 4(6):231-40.
33. Andreasen JO. Relationship between cell damage in the periodontal ligament after replantation and subsequent development of root resorption. A time-related study in monkeys. 1981 Acta Odontol Scand. 39(1):15-25.
34. Lopes-Martins RA, Penna SC, Joensen J, Iversen VV, Bjordal JM. Low level laser therapy (LLLT) in Inflammatory and Rheumatic Diseases: A review of Therapeutic Mechanisms. 2007 Curr Rheumatol Rev. 3(2):147-54.
35. Andreasen JO, Andreasen FM, Skeie A, Hjrting-Hansen E, Schwartz O. Effect of treatment delay upon pulp and periodontal healing of traumatic dental injuries – a review article. 2002 Dent Traumatol. Jun;18(3):116-28.
36. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 2. Factors related to pulpal healing. 1995 Endod Dent Traumatol. Apr;11(2):59-68.
37. Surinchak JS, Alago ML, Bellamy RF, Stuck BE, Belkin M. Effects of low-level energy lasers on the healing of full-thickness skin defects. 1983 Lasers Surg Med. 2(3):267-74.
38. Al-Watban FA, Zhang XY. Comparison of wound healing process using Argon and Krypton lasers. 1997 J Clin Laser Med Surg. 15(5):209-15.
39. Enwemeka CS. 1990 Clin Lab Manage Rev. 10:24-29.
40. Andreasen FM, Pedersen BV. Prognosis of luxated permanent teeth--the development of pulp necrosis. 1985 Endod Dent Traumatol. Dec;1(6):207-20.
41. Shibue T, Taniguchi K, Motokawa W. Pulp and root development after partial extrusion in immature rat molars: a histopathological study. 1998 Endod Dent Traumatol. Aug;14(4):174-81.
42. Toomarian L, Fekrazad R, Tadayon N, Ramezani J, Tunér J. Stimulatory effect of low-level laser therapy on root development of rat molars: a preliminary study. 2012 Lasers Med Sci. May;27(3):537-542.

43. Ferreira AN, Silveira L, Genovese WJ, de Araújo VC, Frigo L, de Mesquita RA, Guedes E. Effect of GaAlAs Laser on Reactional Dentinogenesis Induction in Human Teeth. 2006 Photomed Laser Surg. Jun;24(3):358–65.
44. Genovese WJ. 2000 Low level laser: therapeutic applications in Dentistry, 1st edn. São Paulo: Lovise.

ANEXOS
ANEXOS I
COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba


Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Estudo do processo de reparo do reimplante de incisivos de ratos após o tratamento com laser de baixa potência" sob responsabilidade do Pesquisador CELSO KOOGI SONODA e colaboração de Valdir Gouveia Garcia, Lamis Nogueira Meorin, Wilson Roberto Poi e Sônia Regina Panzarini está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 00250-2012.

CERTIFICATE

We certify that the research "Effect of low-level laser therapy on the healing process after tooth replantation: a histomorphometrical study in rats", process number 00250-2012, under responsibility of CELSO KOOGI SONODA and with collaboration of Valdir Gouveia Garcia, Lamis Nogueira Meorin, Wilson Roberto Poi and Sônia Regina Panzarini agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli
Coordenador CEUA
CEUA Coordinator

ANEXO II

MATERIAL E MÉTODO



Fig. 1 – Luxação do incisivo superior direito



Fig. 2 – Extração do incisivo superior direito



Fig. 3 – Aplicação do LLLT ao longo do comprimento da parede alveolar do dente reimplantado

ANEXO III IMAGENS

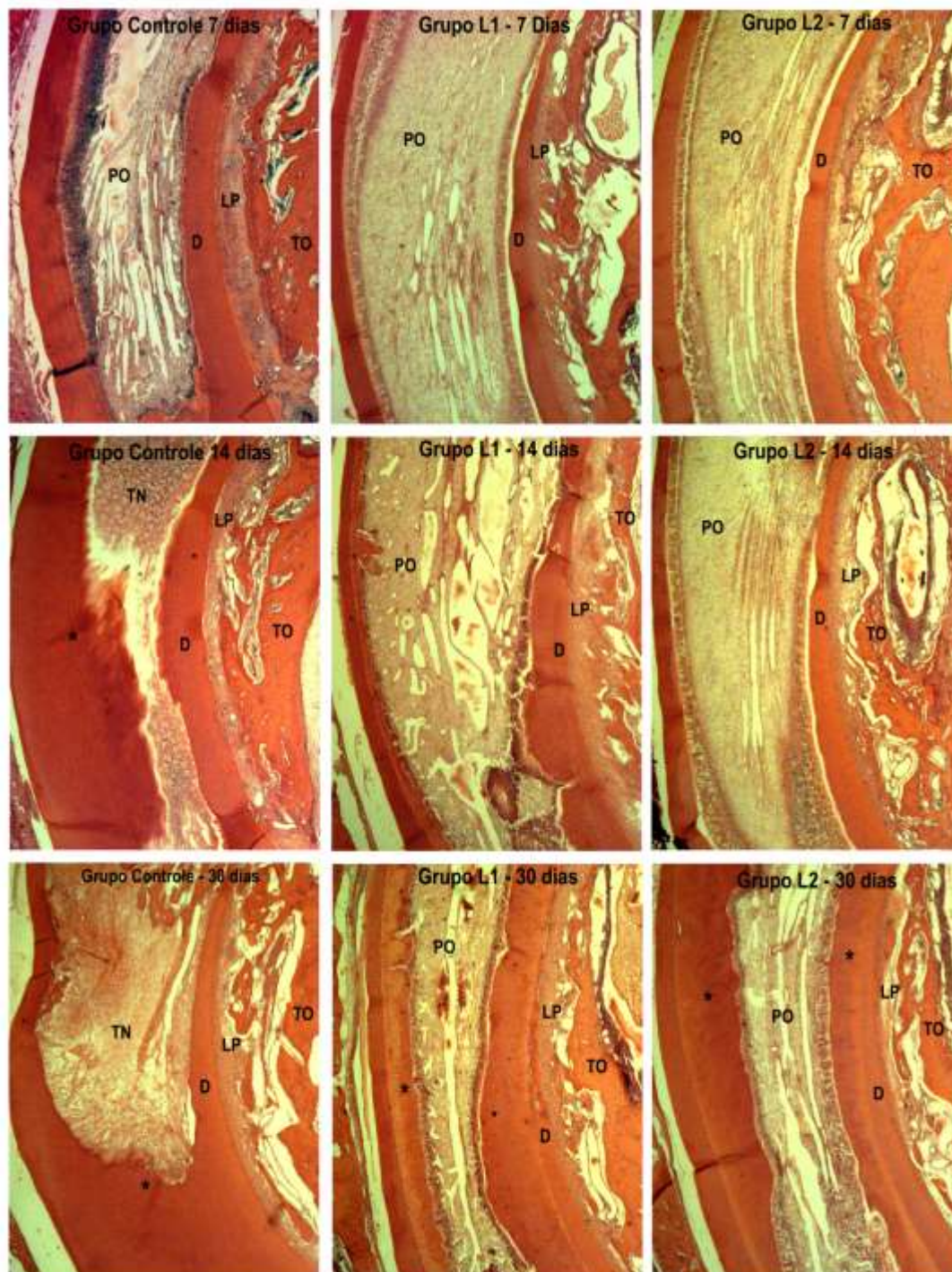


Fig. 4: Fotomicrografias em campo claro de cortes longitudinais de incisivo superior de ratos corados em H.E. Manutenção do ligamento periodontal em todos os grupos, em todos os períodos. Redução da extensão do tecido pulpar nos períodos de 14 e 30 dias, substituído por dentina terciária ou áreas de necrose. Abreviaturas: PO: Tecido Pulpar, TN: Tecido pulpar necrosado TO: tecido ósseo alveolar, LP: ligamento periodontal, D: Dentina, Asterisco: Dentina terciária. Aumento: 20x.

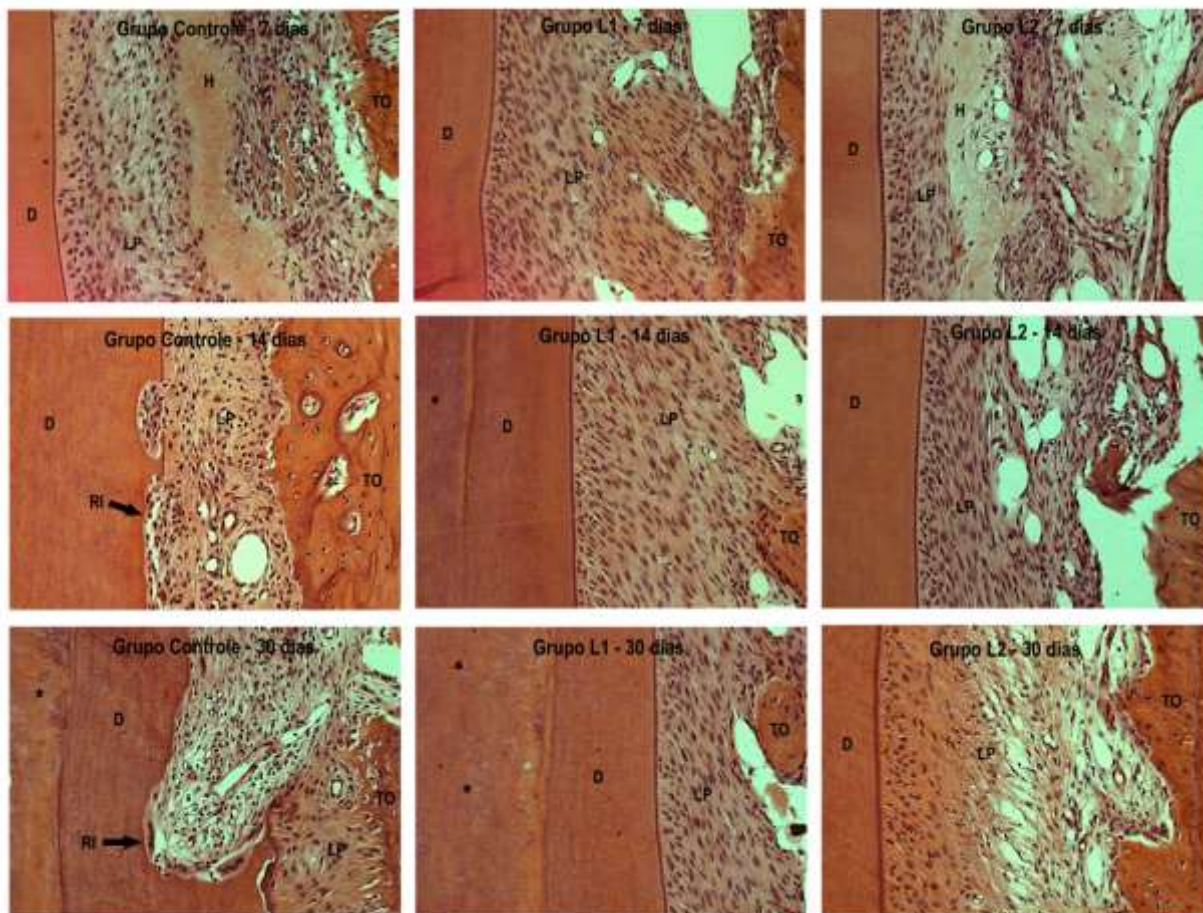


Fig. 5: Fotomicrografias em campo claro de cortes longitudinais de incisivo superior de ratos corados em H.E. Manutenção do ligamento periodontal nos três grupos, em todos os períodos. Período de 7 dias: Ligamento periodontal e infiltrado inflamatório no grupo Controle. Reinserção do ligamento periodontal no grupo L1. Áreas hialinas e ausência de reinserção do ligamento periodontal nos grupos Controle e L2. Períodos de 14 e 30 dias: Grupo Controle com áreas de reabsorção. Ligamento periodontal reinserido nos grupos L1 e L2. Abreviaturas: TO: Tecido ósseo alveolar, LP: ligamento periodontal, H: Área hialina, D: dentina, Asterisco: Dentina terciária, RI: Reabsorção inflamatória. Aumento: 200x.

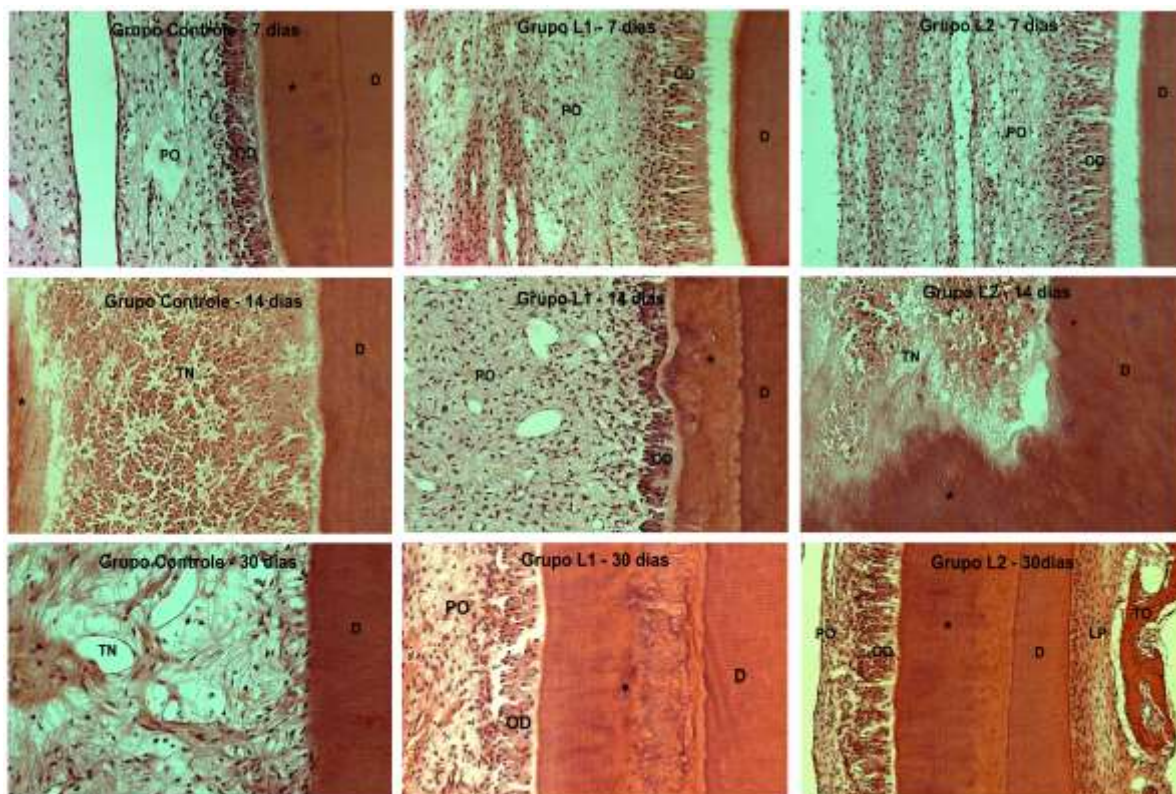


Fig. 6: Fotomicrografias em campo claro de cortes longitudinais de incisivo superior de ratos corados em H.E. com características histológicas da polpa e dentina aos 7, 14 e 30 dias. Período de 7 dias: Tecido conjuntivo frouxo e camada de odontoblastos formando tecido pulpar normal (PO) presente nos três grupos. Períodos de 14 e 30 dias: Remanescentes de fibras colágenas e restos celulares formando o tecido pulpar necrosado, encontrado no grupo Controle. Aspecto da dentina terciária ocupando o espaço do tecido pulpar, nos grupos L1 e L2. Abreviaturas: D: dentina, Asterisco: Dentina terciária. PO: tecido pulpar, OD: Odontoblastos, TN: Tecido pulpar necrosado, LP: Ligamento periodontal, TO: Tecido ósseo alveolar. Aumento: 200x.

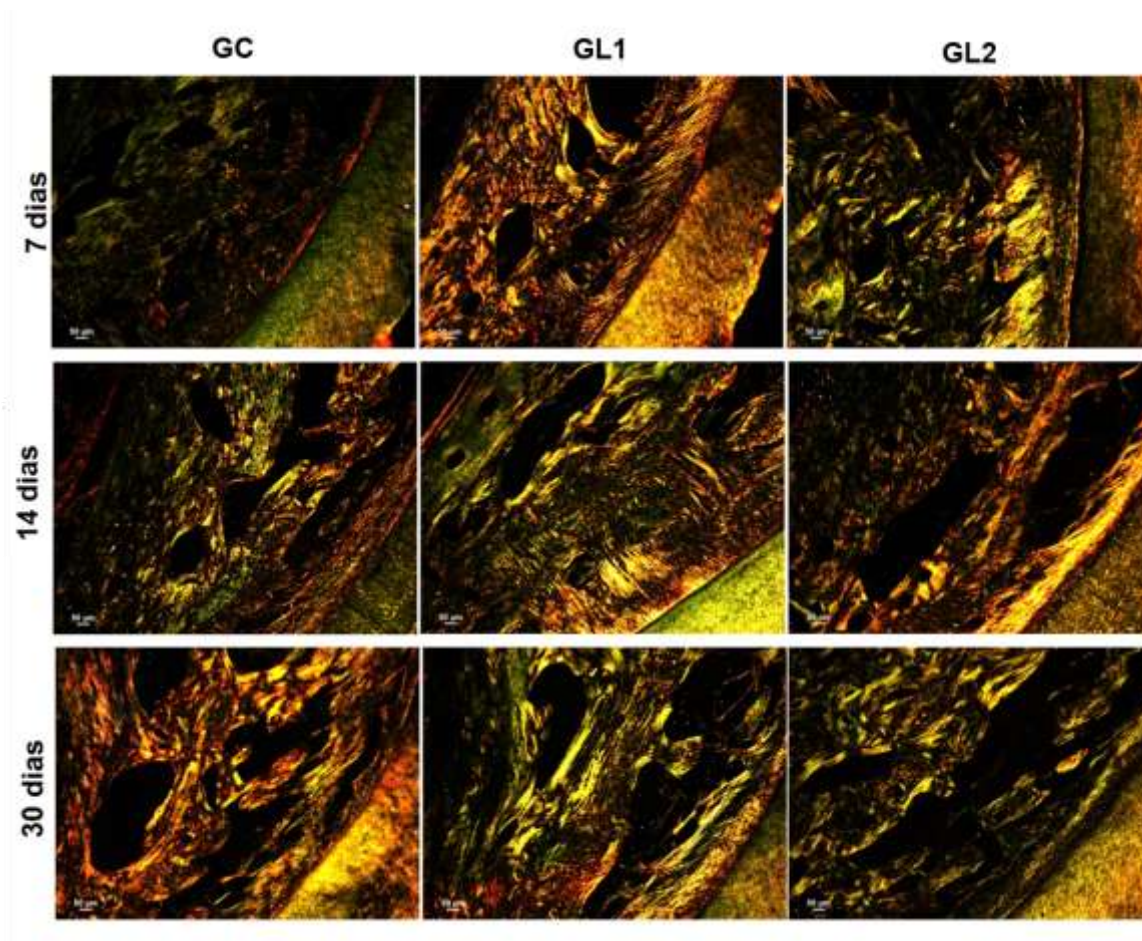


Fig. 7 – Birrefringência das fibras colágenas coradas com Picrosirius Red e observadas sob luz polarizada.

ANEXO IV
TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 - Frequência dos escores entre os grupos em relação à extensão e intensidade do processo inflamatório no ligamento periodontal, no período de 7 dias.

Escore	Extensão inflamação			Intensidade Inflamação		
	C	L1	L2	C	L1	L2
1	1/8	6/9	2/9	1/8	6/9	3/9
2	4/8	3/9	6/9	4/8	3/9	6/9
3	3/8	0/9	1/9	3/8	0/9	0/9
4	0/8	0/9	0/9	0/8	0/9	0/9
*	A	B	Ab	a	b	ab

C(Control); L1 e L2 (Tratados com laser);

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante.

Tabela 2 - Média em porcentagem e desvio padrão das áreas de Ligamento periodontal (LP) Ligamento periodontal reinserido (LPR) e áreas hialinas (H) nos grupos estudados, no período de 7 dias.

Evento	C	L1	L2	Valor de p
LP	89,85 (±9,59)	93,62(±7,27)	92,56 (±6,97)	0,645
LPR	27,28 (±10,28) ^a	54,56(±23,21) ^b	46,93 (±10,83) ^b	0,0094*
H	22,05 (±17,63)	6,98 (±6,88)	7,43 (±6,97)	0,1273
n	8	9	9	

Teste de Dunn para comparação entre os grupos. *Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante. n (número de espécimes por grupo).

Tabela 3 - Frequência dos escores entre os grupos em relação à extensão e intensidade do processo inflamatório no ligamento periodontal, no período de 14 dias.

Escore	Extensão inflamação			Intensidade Inflamação		
	C	L1	L2	C	L1	L2
1	4/8	7/10	2/9	0/8	6/10	4/9
2	4/8	3/10	5/9	5/8	2/10	5/9
3	0/8	0/10	2/9	3/8	2/10	0/9
4	0/8	0/10	0/9	0/8	0/10	0/9
*	a	A	A	a	a	a

C(Control); L1 e L2 (Tratados com laser);

Tabela 4 - Média em porcentagem e desvio padrão da ocorrência de reabsorção inflamatória (R. Inf.), das áreas de Ligamento periodontal (LP) e Ligamento periodontal reinserido (LPR) nos grupos estudados no período de 14 dias.

Evento	C	L1	L2	Valor de p
R Inf.	4,06 ($\pm 6,91$)	0,34 ($\pm 0,73$)	1,38 ($\pm 2,15$)	0,056
L.P.	95,58 ($\pm 12,51$)	100 (± 0)	100 (± 0)	0,305
LPR	23,66 ($\pm 10,81$) ^a	79,01 ($\pm 15,78$) ^b	68,78 ($\pm 16,38$) ^b	0,0002*
N	8	10	9	

Teste de Dunn para comparação entre os grupos.

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante.

Tabela 5 - Média em porcentagem e desvio padrão da extensão de tecido pulpar entre os diferentes períodos no mesmo grupo.

Grupos	7 dias	14 dias	30 dias	Valor de p
C	25,89 ($\pm 11,13$) ^a	12,57 ($\pm 10,74$) ^b	8,99 ($\pm 9,89$) ^b	0,0001*
L1	27,59 ($\pm 12,94$) ^a	28,48 ($\pm 12,42$) ^a	12,79 ($\pm 9,67$) ^b	0,0001*
L2	25,53 ($\pm 14,05$) ^{ab}	29,65 ($\pm 11,99$) ^a	18,88 ($\pm 9,51$) ^b	0,0055*

Teste de Dunn para comparação entre os grupos.

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante.

Numero de espécimes por período: 7 dias (C=8, L1=9, L2=9); 14 dias (C=8, L1=9, L2=9); 30 dias (C=7, L1=9, L2=8)

Tabela 6 - Média em porcentagem e desvio padrão da ocorrência de reabsorção inflamatória (R. Inf.), das áreas de Ligamento periodontal (LP) e Ligamento periodontal reinserido (LPR) nos grupos estudados no período de 30 dias.

Evento	C	L1	L2	Valor de p
R Inf.	9,88 ($\pm 13,08$) ^a	1,25 ($\pm 2,19$) ^{ab}	0,86 ($\pm 1,76$) ^b	0,0123*
L.P.	97,94 ($\pm 5,45$)	97,35 ($\pm 7,93$)	100 (± 0)	0,587
LPR	60,52 ($\pm 16,57$)	74,65 ($\pm 11,55$)	67,46 ($\pm 22,59$)	0,3807
N	7	9	8	

Teste de Dunn para comparação entre os grupos.

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante.

Tabela 7 - Frequência dos escores entre os grupos em relação à extensão e intensidade do processo inflamatório no ligamento periodontal, no período de 30 dias.

Escore	Extensão inflamação			Intensidade Inflamação		
	C	L1	L2	C	L1	L2
1	7/7	7/9	5/8	4/7	5/9	5/8
2	0/7	2/9	2/8	3/7	4/9	3/8
3	0/7	0/9	1/8	0/7	0/9	0/8
4	0/7	0/9	0/8	0/7	0/9	0/8
*	a	A	A	A	a	A

C(Controle); L1 e L2 (Tratados com laser).

Tabela 8 - Média em porcentagem e desvio padrão da extensão de tecido pulpar em cada período.

Período	C	L1	L2	Valor de p
7 dias	25,89 ($\pm 11,13$)	27,59 ($\pm 12,94$)	25,53 ($\pm 14,05$)	0,5126
14 dias	12,57 ($\pm 10,74$) ^a	28,48 ($\pm 12,42$) ^b	29,65 ($\pm 11,99$) ^b	0,0001*
30 dias	8,99 ($\pm 9,89$) ^a	12,79 ($\pm 9,67$) ^a	18,88 ($\pm 9,51$) ^b	0,0018*

Teste de Dunn para comparação entre os grupos.

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante.

Numero de espécimes por período: 7 dias (C=8, L1=9, L2=9); 14 dias (C=8, L1=9, L2=9); 30 dias (C=7, L1=9, L2=8)

Gráfico 1 – Birrefringência das fibras do ligamento periodontal para o espectro de cor verde.

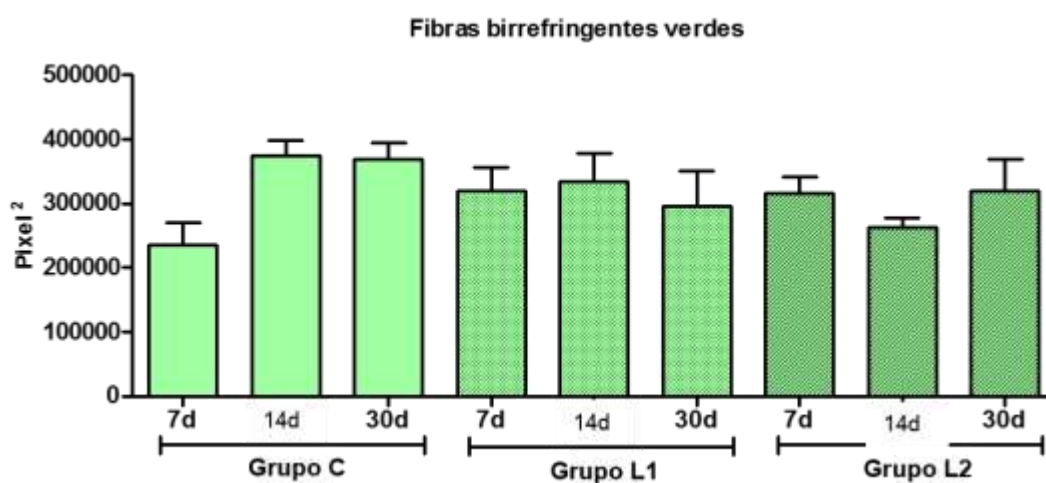


Gráfico 2 – Birrefringência das fibras do ligamento periodontal para o espectro de cor amarela.

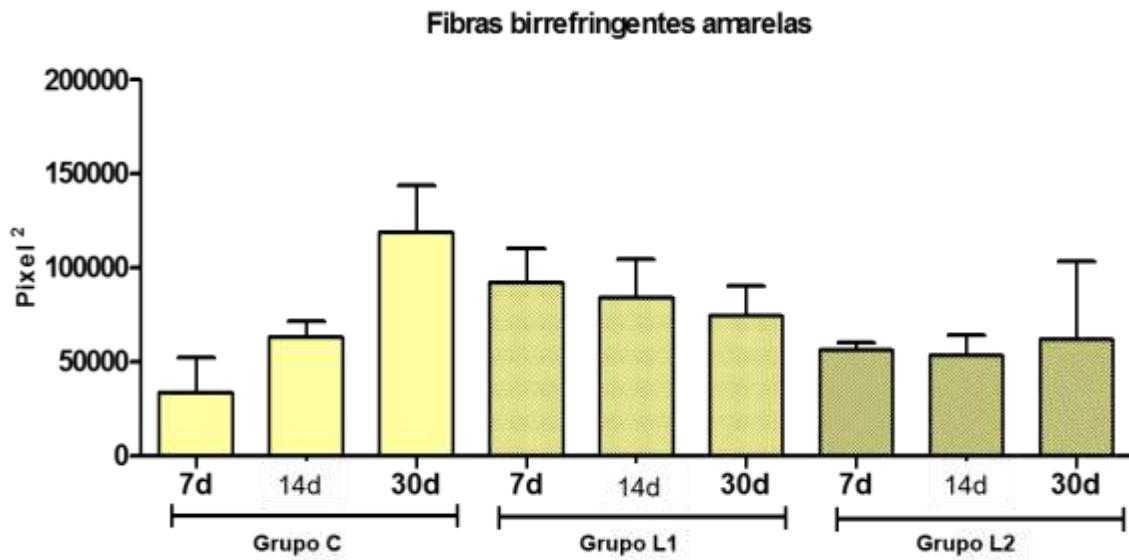


Gráfico 3 – Birrefringência das fibras do ligamento periodontal para o espectro de cor vermelha.

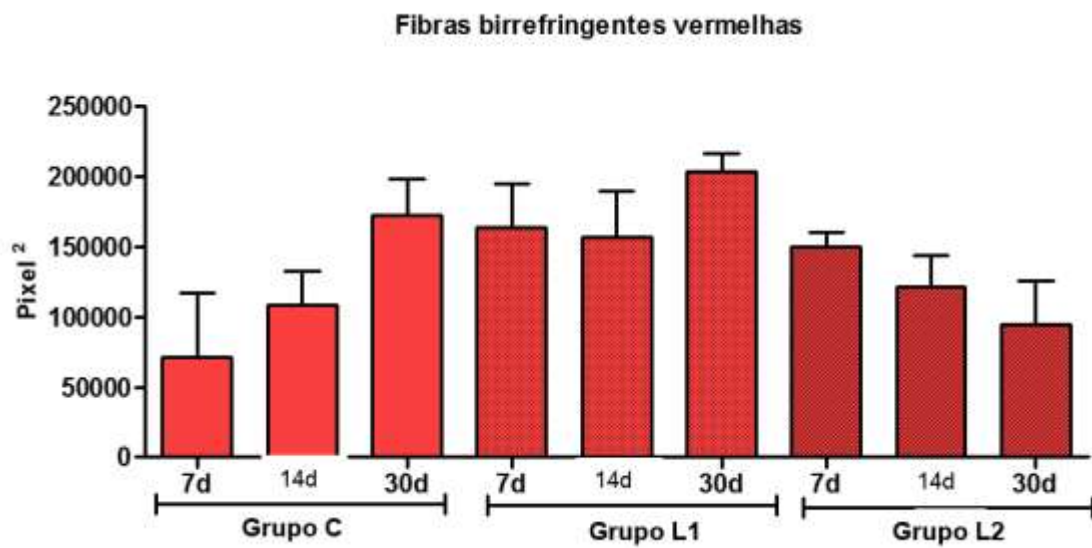
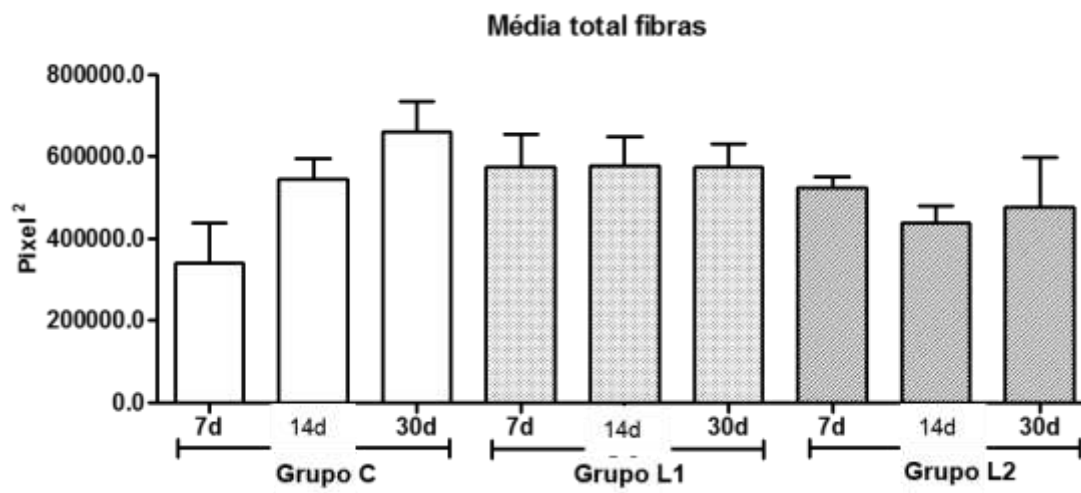


Gráfico 4 – Média da quantidade de fibras birrefringentes qua cada grupo apresentou.



ANEXO V

NORMAS PARA A PUBLICAÇÃO

LASER PHYSICS LETTER

How to prepare your article

Please read these guidelines carefully and familiarize yourself with the style and editorial policies of your chosen journal by examining the online version of recently published articles. It is important to check that your research fits well into the scope of your chosen journal before you submit it. You are also advised to read the [IOP ethical policy](#).

Your article should normally consist of the following:

- a title page with title of article, name(s) of author(s) and address(es) of establishment(s) where the work was carried out
- an abstract
- the text
- figures
- a list of references

The following sections give a brief overview of the main elements or structure of an article. Read them first.

You can find more detail in our [LaTeX](#) and [Word](#) guidelines which are presented in the style of a typical article.

Title page

Title of article

This should be concise but informative.

Authors and addresses

For multiple-authored articles list the names of all the authors first, followed by the full postal addresses, using superscript numeric identifiers to link an author with an address, where necessary (see [LaTeX](#) and [Word](#) guidelines). If an author's present address is different from the address at which the work was carried out, this should be given as a footnote to the page. You can also include e-mail addresses, telephone numbers and fax numbers on the title page.

Short title

This is used at the top of odd-numbered pages in the printed journal and should not exceed 80 characters. You do not need to provide short titles for review or tutorial articles.

Classification numbers

We ask you to supply a list of appropriate classification numbers based on the Physics and Astronomy Classification Scheme ([PACS](#)), published by the American Institute of Physics, and to include a list of keywords.

Abstract

Your abstract should give readers concise information about the content of your article. It should be informative and not only indicate the general scope of the article but also state the main results obtained and conclusions drawn. As the abstract is not part of the text it should be complete in itself; no table numbers, figure numbers, references or displayed mathematical expressions should be included. It should be suitable for direct inclusion in abstracting services and should not normally exceed 200 words.

When readers are searching for information online, an abstract of an article is likely to be the first thing they see. Consequently your abstract needs to be concise but convey as much information as possible about the content of your article.

Text

Research papers and review articles can be divided into numbered sections and subsections.

You should use tables only to improve conciseness or where the information cannot be given satisfactorily in other ways such as by histograms or graphs. Tables should be numbered serially and referred to in the text by number (table 1, etc). Each table should have an explanatory caption which should be as concise as possible.

If your article consists of a very large amount of tabular material such as long lists of crystallographic results, computer programs and spectrographic results we would not normally publish these in full. Instead these may be published online as supplementary data files.

In terms of general style, conciseness in writing helps the reader, but clarity is most important. Short sentences and paragraphs make reading easier. You should aim for consistency within your article in matters such as hyphenation and spelling.

All acronyms and abbreviations should be clearly explained when they first appear in the text, and all units used should be consistent throughout the article.

If English is not your first language, you should ask an English speaking colleague to read through your article and apply a UK English spellchecker to your article.

Mathematics

Detailed information on the presentation of mathematics, formulae and equations is provided in our [LaTeX](#) and [Word](#) guidelines.

Acknowledgments

All authors and co-authors are required to disclose any potential conflict of interest when submitting their article (e.g. employment, consulting fees, research contracts, stock ownership, patent licenses, honoraria, advisory affiliations, etc). This information should be included in an acknowledgments section at the end of the manuscript (before the references section). All sources of financial support for the project must also be disclosed in the acknowledgments section. The name of the funding agency and the grant number should be given.

References

It is vitally important to fully acknowledge all relevant work and we advise that you also consult our **ethical policy** for general guidance on compiling your reference list.

A complete reference should provide your reader with enough information to locate the article concerned and should consist of: name(s) and initials, date published, title of journal or book, volume number, editors (if any) and, for books, town of publication and publisher (in parentheses), and finally the page numbers. Where there are up to ten authors, all authors' names should be given in the reference list. Where there are more than ten authors, only the first name should appear followed by *et al.*

You should take particular care to ensure that the information is correct so that links to referenced articles can be made successfully.

Material which is really a footnote to the text should not be included in the reference list, which should contain only references to bibliographic data.

Copies of cited publications not yet available publicly should be submitted for the benefit of the referees. Unpublished results and lectures should be cited for exceptional reasons only.

Before submitting your article, please ensure you have done a literature search to check for any relevant references you may have missed.

You can use either of the referencing systems, alphabetical (Harvard) or numerical (Vancouver), described below.

For articles prepared in LaTeX, please use the tools provided in your LaTeX class file (for example **IOP's recommended class file**). For articles prepared using Microsoft Word, please refer to the detailed **Word** guidelines, which contain much more detail with examples.

Alphabetical system (Harvard)

In the Harvard alphabetical system the name of the author appears in the text together with the year of publication, e.g. (Smith 2001) or Smith (2001) (as appropriate). Where there are only two authors both names should be given in the text (Smith and Jones 2001) or Smith and Jones (2001); however, if there are more than two authors only the first name should appear followed by *et al.*, (Smith *et al*/2001) or Smith *et al* (2001). If you refer to different works by one author or group of authors in the same year they should be differentiated by including a, b, etc after the date (e.g. 2001a). If you refer to different pages of the same article, the page number may be given in the text, e.g. Smith (2001, p 39). The reference list at the end of your article using this system should be in alphabetical order.

Numerical system (Vancouver)

In the numerical system you should number your references sequentially through the text. The numbers should be given in square brackets and one number can be used to refer to several instances of the same reference. The reference list at the end of the article lists the references in numerical order, not alphabetically.

Figures

Carefully chosen and well-prepared figures, such as diagrams and photos, can greatly enhance your article. We encourage you to prepare figures that are clear, easy to read and of the best possible quality. Characters should appear as they would be set in the main body of the article. We will normally use figures as submitted; it is therefore your responsibility to ensure that they are legible and technically correct.

Note: If you are intending to use previously published figures, you must obtain written permission from the copyright holder before using them in your article.

To get the best possible results in print and online, please consider the following points when preparing your figure files:

- Shading and fill patterns should be avoided wherever possible because diagrams containing them have to be printed as half-tones and undesirable interference patterns may be produced on printing.
- Readers of your online article will probably download and print it on a black and white printer which may make coloured lines difficult to distinguish. To avoid this problem, please consider identifying curves by methods other than colour, for example: by letters (upper case Roman), by the symbols used for the data points (e.g. *, ■) or by the type of line (e.g. —, full curve; - - -, broken curve; - · - · -, chain curve).
- When producing figures using colours, light colours such as yellow, light green, light blue, light grey, etc should be avoided because they generally reproduce poorly during the black and white printing process.
- Wherever possible electronic figures should be tightly cropped to minimize superfluous white space surrounding them. This reduces file sizes and helps the alignment of figures on the printed page.

Detailed information on common graphic formats and their preparation with examples are provided in our [graphics guidelines](#).

Colour figures

The use of colour in figures can enhance the effective presentation of results, and there are no restrictions on the use of colour in the online version of your article. However, because conventional full-colour printing remains an expensive process, we must ask you (or your institution) to pay the additional costs incurred (i.e. the costs over and above the cost of normal black-on-white reproduction) if you also require colour in the printed version of your article.

There is no additional charge for offprints of articles containing colour figures, but authors are reminded that these must be ordered by the time proofs are returned; reprints produced after publication are very expensive.

If you need further information or guidance, please contact the journal.

Figure captions

Your figures should be numbered in the order in which they are referred to in the text. If there is more than one part to a figure (e.g. figure 1(a), figure 1(b) etc), the parts should be identified by a lower-case letter in parentheses close to

or within the area of the figure. Captions should be included in the text and not in the graphics files.

Micrographs should include a scale bar of appropriate size, e.g. 1 μ m.

Supplementary data

All of our journals encourage authors to submit supplementary data attachments to enhance the online versions of published research articles. Supplementary data enhancements typically consist of video clips, animations or supplementary data such as data files, tables of extra information or extra figures. They can add to the reader's understanding and present results in attractive ways that go beyond what can be presented in the print version of the journal.

The printed journal remains the archival version, and supplementary data items are supplements which enhance a reader's understanding of the article but are not essential to that understanding.

Length of submissions

Laser Physics research articles do not normally exceed 12 journal pages.

Laser Physics Letters research articles do not normally exceed 8 journal pages.

Within reason, there is no page restriction on reviews and tutorials.

The length of an article can be calculated by allowing 600 words per page in a B5-sized journal or 900 words per page in an A4-sized journal. Diagrams and tables usually occupy the equivalent of 200-300 words each, and you should allow for this in your total.

What files to submit

We request that you send us your article in electronic form so it can be refereed without postal delays and be published more quickly.

We require you to send a useable PDF file of your article to be transferred to referees for review. All the separate text and figure files for your article must also be supplied when submitting your article.

The guidelines below provide the essential information you need to prepare your article in a form that will enable us to most efficiently process your submission.

Naming your files

Please name all your files according to the following guidelines:

- use only characters from the set a to z, A to Z, 0 to 9 and underscore (`_`);
- do not use spaces in file names;
- include an extension to indicate the file type (e.g., `.doc`, `.txt`, `.eps`, etc);
- do not use any accented characters; for example, `à`, `ê`, `ñ`, `ö`, `ý`, etc because these can cause difficulties when processing your files.

In addition to the above points, please give figure files names which indicate the numbers of the figures they contain; for example, figure1.eps, figure2.tif, figure2a.gif etc. If a figure file contains a figure with multiple parts, for example figure 2(a) to 2(e), give it a name such as figure2a_2e.jpg, and so forth.

Article text files

TeX and LaTeX

- The text of articles may be submitted in any common variant of TeX including LaTeX 2e, REVTeX, AmSTeX, AmSLaTeX and plain TeX.
- Full details and a sample article prepared in LaTeX can be found in our [**LaTeX guidelines**](#).
- A [**class file**](#) for preparing articles using LaTeX 2e is also available for download.
- We have copies of the common packages and class files, and these should not normally need to be sent. If, however, you are using uncommon, customized or personal files then these should be included along with your submission.

Microsoft Word

- We are able to receive articles prepared using Microsoft Word for Windows or Macintosh.
- Full details and a sample article prepared in Word can be found in our [**Word guidelines**](#).
- Fonts used should be restricted to the standard font families (Times, Helvetica, Courier or Symbol). For full details, please refer to our [**Word guidelines**](#).
- If special symbols are needed (e.g. Greek characters, accented characters or mathematical symbols) these should be typed using the appropriate TrueType font. Do not use the Symbol facility on the 'Insert' menu as this often results in font conversion problems.
- Equations must be prepared using Microsoft Word Equation Editor or the full commercial MathType package.

Adobe Acrobat PDF

- The Adobe Acrobat PDF format is suitable for the refereeing process but not the production process. Therefore PDF files should only be supplied in addition to the separate text and figure files for your article.
- Fonts used should be restricted to the standard font families (Times, Helvetica, Courier or Symbol).

Figure files

For articles prepared using Microsoft Word, please make sure all graphics are fully embedded in the Word document and supplied as separate files where possible. For full details, please refer to our [**graphics guidelines**](#).

For articles prepared using LaTeX2e, please make sure that your figures are all supplied as EPS and linked to your main TeX files using appropriate figure inclusion commands such as `\includegraphics`. For full details, please refer to our [**graphics guidelines**](#).

Our preferred graphics format is vector Encapsulated PostScript (EPS). These files can be used directly to give high quality results and file sizes are small in comparison with most bitmap forms. Most graphics software has the facility to save as or export as EPS.

Vector formats

The advantage of vector graphics is that they give the best possible quality at all output resolutions.

In order to get the best possible results, please note the following important points:

- Fonts used should be restricted to the standard font families (Times, Helvetica, Courier or Symbol).
- If vector EPS files include bitmap information, the bitmap should conform to the specification given in the section on **bitmap formats**.
- Certain proprietary vector graphics formats such as Origin, Kaleidagraph, Cricket Graph and Gnu Plot should not be sent in their native format. If you do use these applications to create your figures, please export them as EPS.

For full details, please refer to our **graphics guidelines**.

Bitmap formats

Unlike vector images, which are readily scaleable, bitmap images frequently present quality problems in the production of printed and electronic versions of our journals. Quality is basically dependent on two attributes of a bitmap graphics file: resolution and size (bitmap dimensions in pixels). Low resolution files do not reproduce well, especially when enlarged. Files with small bitmap dimensions are frequently too small to reproduce well at the resolution required for printing and suffer an unacceptable reduction in quality if enlarged. For these reasons, black and white, greyscale and colour bitmap graphics files should all have a resolution of at least 300 dpi (preferably 600 dpi for black and white bitmap graphics files). In addition, the bitmap dimensions should be sufficient to produce an image of adequate size (normally 3 to 6 inches wide, or 900 to 1800 pixels for a 300 dpi image).

Files in most bitmap formats are acceptable, including: TIFF (this is our preferred bitmap format), BMP, GIF and JPEG.

But please note that if your GIF and JPEG graphics files have been derived from Web sites they may not be suitable for printing purposes as they are generally specified at only screen resolution (72 dpi).

Note: If you intend to supply your figures as JPEG files, the following points are important:

- The JPEG compression method *discards image data* and is referred to as 'lossy' compression. When saving directly from an application it is better to choose a loss-less format such as TIFF.
- Although a 'higher quality' compression setting in your software results in less data being discarded, JPEG compression may degrade details in an image-particularly in images that contain type or vector art.

- Do not repeatedly resave a JPEG file because the loss of image data occurs each time you resave the image. Always save JPEG files from the original (non-JPEG) image, not from a previously saved JPEG.

Note on file sizes: For information on how to avoid unnecessarily large bitmap files, please see our [graphics guidelines](#).

Supplementary data files

Video clips and animation

Acceptable formats for video or animation clips are MPEG, QuickTime, Windows AVI or Animated GIF.

Your video or animation clips are intended for internet use via our Web server, and we need to consider the needs of users with slow internet connections (e.g. modem-based users) so that your work can be made available to the widest possible readership.

Please aim to minimize file sizes and data rates, by considering the following points:

- 480 x 360 pixels is the recommended maximum frame size.
- A recommended frame rate is 12-15 frames per second (fps). (Many packages output 30 fps as standard, but you can specify a lower frame rate.)
- Use a 256 colour palette if that is suitable for the presentation of the material.

Please consider the use of lower specifications for all these points if the material can still be represented clearly. Our recommended maximum file size is 3MB. Our recommended maximum data rate is 150 KB/s.

The various formats have different characteristics that you should consider when choosing the format for your material:

MPEG

- Suitable for photo-realistic material.
- Requires users to have a third party viewer.
- We recommend MPEG 1.
- The MPEG standard is specified in terms of millions of colours and at least 24 fps, so you cannot choose lower specifications for these settings.

QuickTime and Windows AVI

- Suitable for computer-generated material.
- Requires users to have a third party viewer.
- We recommend the Cinepak codec for compression. This provides good compression and, importantly, it is widely supported.
- You can often consider the use of a 256 colour palette for computer-generated material.
- As a general rule, we recommend using Quality 75%.

Animated GIF

- Suitable for computer-generated material.

- Animations may be rendered directly in a Web browser without the need for a third party viewer.
- Please use only standard GIF functions as some browsers don't support the whole GIF 89 standard.
- Because GIF compression is not good, consider small frame sizes and low frame rates.

Since the printed journal is the archival copy, a representative frame from your movie or animation should be included in the manuscript as a figure. Include the file size and type of the supplementary data file in the figure caption.

Supplementary data

Data files or extra figures can be submitted in any of the usual formats (PDF, Word, TeX, EPS, GIF, TIFF, etc). In addition, we are happy to consider output files from specialized data processing software and computer program codes. As we will not always be able to check the contents of data files, we request that authors also submit a 'read-me' file containing brief instructions on how to use the file, and a signed statement confirming that the material is as stated and is pertinent to the article. Supplementary data submitted as figures, TeX or Word will appear in the electronic journal in PDF format; specialized files will be offered in their original form.