



**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**



CHAIINE PAVONE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO LASER Er,Cr:YSGG EM
DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS E NO TRATAMENTO DE
DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS SUBMETIDOS
A INALAÇÃO DE FUMAÇA DE CIGARRO**

ARARAQUARA

2014



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



CHAINED PAVONE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO LASER Er,Cr:YSGG EM
DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS E NO TRATAMENTO DE
DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS SUBMETIDOS
A INALAÇÃO DE FUMAÇA DE CIGARRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Odontologia – Área de Periodontia da Faculdade
de Odontologia de Araraquara, Universidade
Estadual Paulista para o título de Doutor em
Odontologia

Orientador: Prof^a Dr^a Rosemary Adriana Chiérici
Marcantonio

ARARAQUARA

2014

Pavone, Chaine

Avaliação dos efeitos do laser Er,Cr:YSGG em defeitos ósseos críticos e tratamento de doença periodontal induzida em ratos submetidos a inalação de fumaça de cigarro / Chaine Pavone.-- Araraquara: [s.n.], 2014.

118 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

1. Lasers 2. Periodontite 3. Nicotina I. Título

CHAINED PAVONE

AVAIACÃO DOS EFEITOS DO LASER Er,Cr:YSGG EM DEFEITOS ÓSSEOS
CRÍTICOS E TRATAMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM
RATOS SUBMETIDOS A INALACÃO DE FUMAÇA DE CIGARRO

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

2º Examinador: Prof.Dr. Claudio Mendes Panutti

3º Examinador: Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto

4º Examinador: Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli

5º Examinador: Profa Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos

Araraquara, 27 de março de 2014

DADOS CURRICULARES

Cháine Pavone

- NASCIMENTO 01 de Fevereiro de 1983
- FILIAÇÃO Pascoal Pavone
Carmem Augusta Alves Pavone
- 2004-2007 Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
- 2008-2009 Curso de Especialização em Periodontia pela Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas – APCD na cidade de São Carlos – SP
- 2008-2010 Curso de pós-graduação em Periodontia - Nível Mestrado. Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

- 2010-2011 Curso de extensão Dentística Estética Integrada –
Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em
Odontologia-FAEPO
- 2010-Atual Curso de pós-graduação em Periodontia – Nível
Doutorado. Faculdade de Odontologia de Araraquara -
UNESP

Dedicatória e Agradecimentos



Dedico este trabalho aos meus pais Pascoal e Carmen Pavone e ao meu irmão Sandy Pavone, esta conquista é de nossa família...eu amo vocês

Agradecimentos

A Deus

Por toda plenitude e presença na minha vida, guiando os meus passos e iluminando o meu caminho sempre na direção do bem. Pela infinita bondade e pela oportunidade de um novo começo em cada dia que eu abro os meus olhos para a vida.

A minha amada mãe, **Carmen Pavone!** Agradecer nunca será o suficiente ou o bastante para mostrar todo o amor que sinto por você. É sem dúvida a maior bênção da minha vida, minha força e meu porto seguro...em você eu encontro tudo que sempre preciso, inclusive o que nem eu mesma sei que preciso. Com você eu tenho a certeza de que somos eternos, porque é a única explicação que encontro para tanta afinidade, amizade e um amor incondicional. Te escolhi nesta vida e te escolherei em todas as outras, porque não posso nem imaginar como eu seria sem a sua presença. Amo sem fim, sempre e pra sempre.

Ao meu amado pai, **Pascoal Pavone.** Obrigada por sempre acreditar em mim e entender minhas limitações, minhas manias e meus defeitos e ainda assim continuar me amando e me apoiando! É olhando para suas lutas, para sua dedicação e amor que consigo ter forças para as minhas batalhas. Essa vitória é nossa, da nossa família, essa que você junto com minha mãe construíram com tanta dignidade e amor. O seu caráter, a sua honestidade e respeito ao próximo me ajudaram a chegar até aqui. Te amo demais!

Ao meu único irmão, **Sandy.** Digo único não por sermos apenas nós dois, mas por ninguém jamais te substituir em meu coração, nem mesmo nosso anjinho, a Aninha. Obrigada pelas infinitas vezes que me ajudou, suportou meu mau humor, me ensinando até nos momentos em que eu achei que estivesse te dando alguma lição. Obrigada por

ser tão você, amável, compreensível, nervoso e cabeça dura. Obrigada por me mostrar que independente das situações, ser feliz é um estado de espírito, obrigada pelo seu amor! Amo você com todo meu coração.

As minhas avós **Maria Aparecida** e **Genoveva**. Vocês me ajudaram de maneiras tão diferentes que mal consigo expressar. É no exemplo, na honestidade, dignidade e amor de vocês que consigo entender o verdadeiro sentido de família e da importância que ela tem em nossas vidas. Obrigada pela força, pela superação e pelo exemplo de vida! Sem vocês nada seria possível.

A minha orientadora e tanto mais, **Adriana Marcantonio**. Sem você eu jamais chegaria até aqui, com você descobri o meu caminho nessa profissão tão linda e abençoada! Obrigada pela sua paixão, dedicação, orientação e paciência mas acima de tudo obrigada por me conhecer, acreditar, por não ter desistido de mim e por ter me levantado tantas vezes em que eu pensei não ser possível. Com o seu amor e carinho, você me fez uma mulher melhor, disposta a lutar com todos os problemas da vida e sair vitoriosa mesmo com o coração cansado! Você é meu exemplo, como um dia nosso amado e inesquecível tio Du foi na minha vida. Obrigada pela doçura que sempre esteve presente, até mesmo nas broncas necessárias, obrigada por fazer parte da minha vida!

Ao querido professor **Elcio Marcantonio Júnior**, por todo o seu conhecimento, empenho, dedicação e amor pela profissão. Obrigada por todas as oportunidades que me deu, foram elas que ajudaram a minha formação e por elas que tenho vontade de crescer ainda mais. Obrigada por se importar, pelas brincadeiras e por me mostrar os diferentes caminhos que podemos seguir. Minha eterna gratidão e reconhecimento!

Aos professores Joni Cirelli, Silvana Orrico, Carlos Rossa, José Eduardo Sampaio e Daniela Zandim que desde a graduação têm me acompanhado e me ensinado sobre odontologia e ainda mais sobre a periodontia. Obrigada pelos exemplos e por compartilharem de forma tão generosa o conhecimento adquirido em anos de profissão.

Aos meus amigos do departamento **Zezé, Claudinha, Leandro, Dona Maria e Isabela**. Obrigada pela disponibilidade, paciência e dedicação com as quais sempre me ajudaram. A amizade, o carinho e respeito de vocês, me ajudaram a concluir mais essa fase importante da minha vida.

Aos meus queridos amigos **Cássio e Guilherme**. Um muito obrigada especial a vocês pela infinita paciência, compreensão, amizade e respeito que sempre tiveram comigo. Nossa parceria está além da faculdade e com vocês estou sempre aprendendo lições na profissão e lições de vida também. Estarmos juntos na sala de estudo ou na mesa do barzinho é sempre uma felicidade. Espero ter correspondido da mesma maneira! Obrigada por tudo.

Ao amigo, **Rubens Spin Neto** que me acompanha desde a iniciação científica. Com você tive meus primeiros ensinamentos sobre o que seria a pós-graduação...na felicidade de novas descobertas ou na tristeza de hipóteses não comprovadas. Mas acima de tudo, obrigada por ser uma inspiração como profissional e ser humano. Sou grata por ter trabalhado ao seu lado e ter aprendido que é possível colocar sempre o coração até mesmo nas coisas mais racionais que existem. Obrigada por estar sempre disposto a ensinar e aprender ao mesmo tempo.

A todos os colegas, amigos e alunos da pós-graduação pelas experiências compartilhadas, pelo convívio constante, pela ética no trabalho e pelo respeito a ciência.

As minhas amadas e especiais amigas **Andressa, Michele, Sabrina, Telma, Lúgia, Sâmia e Shelon**. Sem a amizade verdadeira de vocês tudo seria mais difícil, obrigada por tudo que encontro em cada uma de vocês....carinho, compreensão, força, respeito, cumplicidade e amor. Obrigada por me aceitarem exatamente como eu sou e por dividirem a vida de vocês comigo. Não importam as dificuldades, quando estamos juntas tudo fica mais leve, mais fácil de resolver, os problemas se tornam tão pequenos, que parecem insignificantes e tudo se transforma em uma grande palhaçada, uma alegria sem tamanho. Poder compartilhar minha vida com vocês é um grande presente que quero ter sempre. Amo demais cada uma de vocês!!

A **Gabi Liedke, Marina Guimarães Roscoe, Priscila Corraini, Carolina Neto Rodrigues e Carolina Bizelli Siveira**. Obrigada pelo incrível tempo que passamos juntas nos meses que fiquei na Dinamarca. Vocês já têm um lugar especial no meu coração e quero sempre mantê-las por perto.

As minhas amigas **Mariana Marques, Gisele Amaral, Juliana Feltrin, Ana Livia Cornélio**! Muito obrigada pelas inúmeras vezes que me escutaram, me incentivaram e me aguentaram, vocês sabem tanto desse trabalho como eu!! Agradeço a amizade, o carinho, o apoio e a companhia (mesmo a distância) em inúmeros momentos da minha vida. Vocês são mais do que especiais!!

A Faculdade de Odontologia de Araraquara, representada pela diretora Prof^a. Dr^a Andréia Affonso Barretto Montandon e vice-diretora Prof^a Dr^a Elaine Maria Sgavioli Massucato.

Ao programa de pós-graduação em Odontologia, área de concentração em Periodontia, pelo apoio e infraestrutura imprescindíveis para realização deste projeto.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido ao projeto e pela bolsa de doutorado que me permitiu desenvolver com tranquilidade este trabalho.

Επίγραφε



“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?.”

Fernando Pessoa

Resumo



Pavone C. Avaliação dos efeitos do laser Er,Cr:YSGG em defeitos ósseos críticos e tratamento de doença periodontal induzida em ratos submetidos a inalação de fumaça de cigarro [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar as influências do laser Er,Cr:YSGG na criação e reparo de defeitos críticos e no tratamento de doença periodontal em ratos submetidos a inalação de fumaça de cigarro. Utilizou-se 180 ratos, divididos em 6 grupos: Fumante Raspagem (FRAR) - inalação de fumaça de cigarro (IFC), indução da doença periodontal (IDP), e tratamento com raspagem e alisamento radicular (RAR); Fumante Laser (FL) - IFC, IDP e irradiação com o laser de Er,Cr:YSGG (Laser); Fumante Raspagem + Laser (FRAR+L) - IFC, IDP e tratamento com RAR+Laser; Raspagem (RAR) – IDP e RAR; Laser (L) – IDP e Laser; Raspagem + Laser (RAR+L) – IDP e RAR+ Laser. Os resultados histométricos mostraram que em todos os grupos avaliados houve tendência a formação óssea ao longo dos períodos, no entanto essa diferença foi significativa apenas no grupo FRAR, comparando os períodos de 15 e 30 dias ($p < 0,05$). A comparação intergrupos mostrou que no período de 15 dias, grupo FL a porcentagem de área óssea foi maior no grupo FL em relação ao grupo FRAR. Nenhuma diferença significativa foi observada nos grupos não expostos a inalação de fumaça de cigarro. Na reação por PCR-tempo real, os grupos L e RAR+L mostraram maior expressão de VEGF aos 30 dias ($p < 0,05$) comparados aos 15 dias ($p < 0,01$). O grupo FRAR mostrou menor expressão de VEGF aos 30 dias ($p < 0,05$) em relação aos 15 dias. Para criação dos defeitos, 100 ratos foram divididos em 4 grupos: GT: criação do defeito com trefina; GL: defeito criado com o laser; GFT: IFC e criação do defeito com trefina; GFL: IFC e criação de defeito com o laser. Histometricamente, o defeito foi menor no

grupo trefina aos 30 e 60 dias em relação ao período inicial ($p < 0,05$). No grupo laser essa diminuição ocorreu aos 15, 30 e 60 dias comparados ao período inicial ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) e aos 30 e 60 dias em relação aos 7 dias ($p < 0,05$ e $p < 0,01$). Nos animais expostos a inalação de fumaça de cigarro, houve maior reparo no grupo laser comparado ao trefina no período de 60 dias ($p < 0,001$), dentro do grupo trefina houve diminuição no comprimento do defeito aos 30 dias comparado aos 7 dias ($p < 0,05$) e no grupo laser essa diminuição foi observada nos períodos de 15 ($p < 0,05$), 30 ($p < 0,05$) e 60 dias ($p < 0,01$) em relação aos períodos de 0 e 7 dias. Concluiu-se que o laser de Er,Cr:YSGG associado ou não a raspagem e alisamento radicular (RAR) promoveu condições favoráveis ao reparo tecidual e quando utilizado na criação dos defeitos críticos em calota, este laser proporcionou cortes precisos sem causar danos térmicos aos tecidos subjacentes, favorecendo o reparo na região, independente da exposição a fumaça de cigarro.

Palavras-chave: Lasers, periodontite, nicotina

Abstract



Abstract

Pavone C. Evaluation of the effects of Er, Cr: YSGG laser in critical bone defects and treatment of periodontal disease induced in rats subjected to inhalation of cigarette smoke [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014

The aim of this study was to evaluate the influence of the Er, Cr: YSGG laser in critical-size defects and in the treatment of periodontal disease in rats subjected to cigarette smoke inhalation. It was used 180 rats divided into 6 groups: Cigarette Smoke scaling (CSRP) - cigarette smoke inhalation (CSI), induction of periodontal disease (IPD) and scaling and root planing (SRP); Cigarette Smoke Laser (CL) – CSI, IPD and Er,Cr:YSGG laser irradiation; Cigarette Smoke SRP+Laser (CSRP+L) – CSI, IPD and RAR + Laser; Scaling and root planing (SRP) IPD, SRP; Laser (L) – IPD and Laser; Scaling and root planing + Laser (SRP+L) – IPD and SRP followed by Laser. The histometric results showed that in all groups analyzed it was observed a tendency to bone formation over the periods, however this difference was only significant in the CSRP comparing 15 and 30 days ($p < 0,05$).

The intergroup comparison showed that the 15-day period, the percentage of bone area was greater in the FL group compared to FRAR group. No difference was observed in the groups not exposed to cigarette smoke inhalation. In reaction by real-time PCR, L and SRP + L groups showed higher expression of VEGF at 30 days ($p < 0,05$) compared to 15 days ($p < 0,01$). The FRAR group showed lower expression of VEGF at 30 days ($p < 0,05$) compared to 15 days. For creation of the defects, 100 rats were divided into 4 groups: GT: creation of the defect with trephine; GL: defect created with the laser; GFT: IFC and creation of defect with trephine; GFL: IFC and creating defect with the laser. The results showed that histometrically, the defect was lower in the trephine group at 30

and 60 days compared to the initial period ($p < 0.05$). In the laser group this decrease occurred at 15, 30 and 60 days compared to the initial period ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) and at 30 and 60 days compared to 7 days ($p < 0, 05$ and $p < 0.01$). In animals exposed to cigarette smoke inhalation, there was a higher repair in the laser group compared to trephine in 60 days ($p < 0.001$). Intragroup analysis showed that in the trephine group there was a decrease in the length of the defect at day 30 compared to day 7 ($p < 0.05$). This decrease in the laser group was observed at 15 ($p < 0.05$), 30 ($p < 0.05$), and 60 days ($p < 0, 01$) compared to 0 and 7 days. It was concluded that the Er, Cr: YSGG laser with or without scaling and root planing (SRP) promoted favorable conditions for tissue repair and when used in the critical size defects creation, this laser provided precise cuts without causing thermal damage to surrounded tissues, favoring the repair in the region, regardless of exposure to cigarette smoke inhalation.

Keywords: Lasers, periodontitis, nicotine

SUMÁRIO

1 Introdução	23
2 Proposição.....	33
3 Material e Método.....	35
Estudo I.....	36
3.1 Inalação da fumaça de cigarro.....	36
3.2 Indução da doença periodontal.....	37
3.3 Análise histológica/histométrica.....	39
3.4 Análise imuno-inflamatória.....	40
3.5 PCR – Tempo Real.....	41
3.6 Análise estatística.....	42
Estudo II.....	43
3.7 Procedimentos cirúrgicos	43
3.8 Processamento dos tecidos	45
3.9 Análise histométrica	45
3.10 Análise estatística	46
4 Capítulo 1.....	48
5 Capítulo 2.....	72
6 Considerações finais.....	94
7 Conclusão.....	99
Referências	101
Anexos.....	117

1 Introdução



1 Introdução

Um inadequado controle de higiene oral tem como consequência o acúmulo de biofilme bacteriano nas superfícies dentais e o estabelecimento desse complexo ecossistema estimula reações imuno-inflamatórias que resultam no desenvolvimento das gengivites e periodontites ¹⁰⁰. A progressão e a severidade das doenças periodontais dependem da ocorrência simultânea de diversos fatores, tais como: presença de patógenos periodontais, meio ambiente adequado para sobrevivência desses microorganismos e suscetibilidade local e sistêmica do hospedeiro ^{84, 95}. Restaurações e próteses mal adaptadas, distúrbios oclusais, modificações anatômicas, condições sistêmicas, doenças crônicas e hábitos sócio-culturais são algumas condições que podem alterar as características clínicas das doenças periodontais ^{26, 27, 40}. Dentro dos principais agentes modificadores, o hábito de fumar é considerado um dos principais fatores de risco para as doenças periodontais ^{12, 86}.

De acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde) a estimativa de fumantes entre a população mundial é de 1 bilhão e 200 milhões e esse número tende a aumentar de forma exorbitante nas próximas décadas (World Health Organization 2011). Segundo o relatório publicado sobre a epidemia global de tabagismo, o cigarro é considerado um fator de risco para seis entre as oito principais causas de morte mundial, sendo responsável por 4,9 milhões de óbitos anuais ⁹⁹. Em apenas um cigarro há mais de 4.000 substâncias tóxicas (monóxido de carbono, alcatrão, benzopireno, cádmio, tiocianato) e a nicotina é seu principal constituinte, responsável pela dependência psíquica desta droga ^{31, 83}. Trata-se de um composto alcalóide, solúvel em água e lipídeos rapidamente absorvido por todo o organismo, atingindo na corrente sanguínea o pico máximo de sua concentração em apenas 10 minutos após a tragada ^{18, 42}. O contato

da nicotina com o sistema nervoso central acontece em média de 8 a 20 segundos depois de uma tragada e o modo como essa substância causa a dependência dos seus usuários está relacionada a ativação da via mesolímbica (via do prazer) ^{67, 82}. Em condições fisiológicas normais, esta via é ativada pela ligação da acetilcolina a receptores nicotínicos-acetilcolínicos (nAChRs) presentes nos neurônios e em várias regiões do cérebro, ligando canais com estrutura e funções diferentes ⁵⁵. Como resultado, após fumar um cigarro são liberados hormônios psicoativos, neurotransmissores e neuroreguladores, incluindo a dopamina que causa um estado de euforia e prazer nos fumantes, estimulando-os a usar essa droga cada vez mais ^{1, 67, 82}. Dependendo da quantidade de maços consumidos e do teor de nicotina presente em cada cigarro, a concentração diária de nicotina presente no organismo pode variar de 10 a 70mg e sua metabolização resulta na produção de várias substâncias, entre elas a cotinina, importante marcador biológico utilizado para avaliar o consumo de nicotina em um determinado espaço de tempo. Esse metabólito possui uma meia vida de 18h (cerca de 9x maior que a nicotina) o que permite sua detecção nos diferentes fluidos muitas horas depois do último cigarro ter sido fumado. Em média, no plasma, na saliva e na urina as concentrações de cotinina encontradas podem ser de 294, 330 e 1448 ng/mL, respectivamente ^{5, 37, 38}.

O cigarro contém outros milhares de produtos tóxicos que atuam na vascularização periférica, nas células do sistema imunológico, na liberação de citocinas, na degradação de colágeno, nos processos de cicatrização e no reparo dos tecidos ósseos ^{44, 50, 54, 68}. A ação negativa do cigarro em todas essas vias metabólicas essenciais o tornaram um importante fator de risco para as doenças cardiovasculares,

respiratórias, auto-imunes e doenças periodontais, além de ser apontado como agente desencadeador de cânceres pulmonares e bucais ⁶⁵.

A hipótese de que o cigarro poderia ser um fator de risco para as doenças periodontais começou a ser esclarecida na década de 80 com os primeiros estudos de Bergström J ¹² e Feldman RS ³⁹. A partir de então, inúmeros estudos transversais, caso-controle e longitudinais foram realizados, mostrando consistência e forte relação causal entre o fumo e as doenças periodontais. Gelskey ⁴⁵ (1999) constatou que o tabagismo atende a oito dos nove critérios de causalidade estabelecidos por Sir Bradford Hill (Força de associação, consistência, especificidade, temporalidade, dose-resposta, plausibilidade biológica, coerência e analogia), comprovando que o cigarro influencia negativamente a progressão e severidade das doenças periodontais ^{13, 58}. Um dos mais extensos estudos epidemiológicos foi realizado por Tomar, Asma ⁹² (2000). A avaliação de uma amostra da população dos Estados Unidos (12.329 adultos) de 1988 a 1994, mostrou que os fumantes têm 4x mais chances de desenvolver periodontite que os não fumantes e esse risco pode aumentar em até 5,6x nos fumantes pesados (consumo de 31 cigarros ao dia). Diversos estudos comprovaram ainda que tabagistas apresentam maior perda clínica de inserção, maior profundidade de sondagem, maior perda óssea, maior envolvimento de furca e menor número de dentes ^{8, 10, 19, 26, 49, 51, 63, 89}. O cigarro pode ainda modificar o meio ambiente da cavidade oral, a vascularização, os tecidos gengivais, a resposta inflamatória, o potencial de reparo periodontal e o "turn over" ósseo. É importante considerar que os malefícios causados pelo cigarro estão relacionados a exposição contínua e prolongada a que se submetem os fumantes ^{31, 37, 59}.

A relação estabelecida entre o hábito de fumar e a composição do biofilme subgengival foi avaliada em vários estudos. Enquanto alguns mostraram que não houve

diferença estatística na prevalência de periodontopatógenos entre fumantes e não fumantes ^{75, 87}, outros estudos revelaram que pacientes fumantes podem ter maiores proporções de *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* ^{51, 60, 103}.

Além do aspecto microbiológico, o cigarro pode ainda modificar diferentes mecanismos da resposta imunológica, alterando as funções dos neutrófilos, a proliferação de linfócitos T e B, quimiotaxia e os níveis séricos de imunoglobulinas G ^{47, 96} e imunoglobulina A ⁷⁰. Associado a isto, a maior expressão de citocinas pró-inflamatórias e diminuição das moléculas anti-inflamatórias também foram relatadas em alguns estudos. Bostrom et al. ¹⁵ (1998) confirmou que em pacientes com periodontite moderada a severa, os níveis de TNF- α no fluido crevicular gengival (FCG) foram maiores em fumantes com periodontite e Giannopoulou et al. ⁴⁶ (2003) observaram maiores expressões de IL-8 nos tabagistas com gengivite. Níveis de IL-6, IL-1 β e IL-1ra no fluido gengival de pacientes periodontais foram avaliados e nenhuma diferença estatística foi observada entre fumantes e não-fumantes ^{16, 17}. No entanto em 2003, Rawlinson et al. ⁷⁷ mostraram níveis menores de IL-1 β e IL-1ra no fluido gengival coletado em sítios de pacientes periodontais tabagistas.

Estudos in vitro relataram que a nicotina e os outros componentes tóxicos do cigarro também causam danos na adesão, orientação e proliferação dos fibroblastos, reduzindo a produção de colágeno e fibronectina e aumentando a atividade da colagenase ^{76, 90}. Chang et al. ²³ (2002) confirmaram ainda que a nicotina pode inibir a proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal de acordo com a dose administrada. Outro processo importante no reparo tecidual e negativamente influenciado pelo cigarro é a vascularização. O fumo produz vasoconstrição periférica,

diminuição do número de vasos presentes nos tecidos inflamados e menor expressão de ICAM-1^{24, 78}. Clinicamente estas ações podem ser confirmadas pela diminuição dos níveis de sangramento marginal, sangramento a sondagem e menores sinais e sintomas da gengivite^{14, 35}.

O consumo contínuo de cigarro também causa efeitos nocivos ao metabolismo ósseo e essa influência negativa pode estar mais fortemente associada as substâncias presentes no cigarro do que a nicotina propriamente dita^{22, 50}. O hábito de fumar pode acelerar os índices de perda óssea vertical e horizontal ao longo do tempo, aumentar o risco de fraturas, diminuir a densidade óssea, reduzir a osseointegração ao redor dos implantes, alterar a diferenciação celular e diminuir o reparo ósseo^{61, 71, 79, 98, 100}.

Os efeitos nocivos que o cigarro causa na vascularização, nos fibroblastos e no tecido ósseo alteram os processos de reparo e cicatrização dos tecidos periodontais e podem estar relacionados a resposta deficiente que os pacientes fumantes apresentam após os tratamentos básicos, cirúrgicos e regenerativos.

A terapêutica periodontal envolve uma série de etapas e procedimentos que têm por objetivo principal restaurar biologicamente as superfícies radiculares e permitir uma nova inserção dos tecidos periodontais. Para isso, são realizados procedimentos de raspagem e alisamento radicular, cirurgias a retalho, técnicas regenerativas, terapias de manutenção e um constante controle da higienização oral de cada paciente. Os resultados alcançados com esses tratamentos são bastante satisfatórios, diminuindo de maneira significativa os sinais e sintomas das gengivites e periodontites³⁶. No entanto, diante de condições variadas que podem interferir negativamente no quadro clínico do paciente periodontal, é necessário o desenvolvimento de novas técnicas e instrumentos capazes de melhorar o prognóstico destes casos. Neste contexto, o uso do laser pode

facilitar o tratamento com os instrumentos convencionais e inovar o campo da Periodontia.

Os lasers são equipamentos que emitem um tipo de luz com características únicas e específicas capaz de interagir com diferentes meios e tecidos. Como o próprio nome diz LASER - *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, a produção de luz nos lasers segue os princípios da emissão estimulada de radiação, descrita por Einstein no início dos anos de 1900⁴⁸. Essa teoria é baseada no modelo atômico e na mudança do nível energético dos elétrons: o átomo é composto por um núcleo e um sistema de órbitas com diferentes níveis de energia nos quais encontram-se os elétrons em equilíbrio ou no estado fundamental. Quando estimulado, o elétron pode mudar de uma órbita de menor energia para outra mais externa com um nível energético maior, entrando assim para o estado excitado, uma vez que esse novo estado é de desequilíbrio, o elétron volta espontaneamente para a sua órbita de origem. Essas transições de órbitas só podem ocorrer quando o elétron absorve ou libera uma determinada quantidade de energia, denominada *fóton*. A emissão estimulada acontece quando esse processo de emissão espontânea é acelerado, ou seja, quando um fóton externo entra em contato com um elétron já excitado, estimulando a liberação de um outro fóton, portanto quando esse elétron retorna ao seu estado fundamental, são liberados dois fótons idênticos ao invés de um^{2, 43, 87}. Os aparelhos lasers foram desenvolvidos de tal forma que todos os fótons que emergem desse sistema entram novamente em contato com os elétrons, amplificando a emissão espontânea de radiação^{56, 80}.

Um laser é constituído basicamente por três partes: 1- meio ativo (líquido, gasoso ou sólido) que contém os átomos ou moléculas com os elétrons liberadores dos

fótons constituintes da luz laser; 2- uma fonte de energia externa, que irá atuar no meio ativo e emitir energia suficiente para excitar os elétrons e 3- a cavidade óptica ou ressonador, constituída por dois espelhos colocados nas extremidades dessa cavidade responsáveis pela reflexão dos fótons emitidos e assim produzir mais e mais emissão estimulada. Uma porção dessa luz produzida emerge desse sistema, constituindo o feixe de luz laser. As características desta luz são bastante específicas e especiais: é monocromática, composta por apenas um comprimento de onda, produzindo um espectro de luz linear, é coerente (ondas sincronizadas) e colimada, sendo paralelas entre si e seguindo uma mesma direção. Além disso o feixe de luz laser pode alcançar uma intensidade extremamente grande e sua potência pode atingir ordens de tera watt (10^{12} W) ^{4, 56}. Uma vez em contato com os tecidos, essa luz pode ser refletida, dissipada, transmitida ou absorvida. Esses efeitos dependem de inúmeras variáveis, incluindo: comprimento de onda, tipo de tecido irradiado, tempo de aplicação, tipo de laser utilizado, angulação, potência, entre outros. Diante de tanta variedade os lasers podem ser didaticamente divididos em dois grandes grupos: lasers de baixa intensidade e os de alta intensidade ^{80,87}. Os lasers de baixa intensidade podem estimular os processos metabólicos, favorecendo a cicatrização, reparo, hemostasia, analgesia e diminuição das infecções ⁸³. Já os de alta intensidade são mais aplicados em cirurgias dos tecidos moles e duros e na remoção de biofilme bacteriano. Neste último grupo estão os lasers Erbium (Er:YAG, Er,Cr:YSGG) que apresentam propriedades bastante interessantes para todas as áreas da Odontologia ^{25, 83, 94}.

Estudos com o laser de alta intensidade Erbium, impregnado por Cromo: Ítrio-Scândio-Gálio-Garnet (Er,Cr:YSGG) denominado WaterlaseTM (Biolase, USA) têm apresentado resultados promissores quanto a sua aplicação. Ele foi desenvolvido com

um sistema hidrocínético que envolve a energia do laser com um spray de água e ar capaz de minimizar as influências térmicas sobre os tecidos circunvizinhos. Possui como meio ativador cristais heterólogos, como o *erbium*, *yttrium*, *gallium* e *garnet* e emprega um cristal de érbio-cromo: YSGG com um sistema de fibra terminando numa peça de mão com um cristal de safira. Este laser emite feixe de luz pulsátil com comprimento de onda de 2.780 nm (infravermelho), 20 Hz de frequência, energia de pulso variando entre 0 e 300 mJ e potência média ajustável entre 0.0 e 6.0 W^{33, 72}. Estudos recomendam este laser para incisões, excisões, vaporização e coagulação em tecidos moles e para procedimentos nos tecidos ósseos incluindo ressecções, osteotomias e plastias, promovendo melhores condições no pós-operatório, diminuição dos riscos de infecção e decréscimo no tempo de cicatrização^{7, 9, 64, 97, 102}. Da mesma maneira que o Er:YAG, este laser pode ainda ser utilizado na remoção de cálculo da superfície radicular com um rendimento comparável aos instrumentos manuais e ultrassônicos^{34, 52, 91}. O estudo clínico realizado por Kelbauskiene et al. (2010)⁶² utilizaram o laser de Er,Cr:YSGG no tratamento de periodontite associado ou não a raspagem e alisamento radicular (RAR). Durante o acompanhamento dos pacientes realizado aos 2, 3, 6 e 12 meses pós tratamentos, a melhora nos índices de profundidade de sondagem e nível de inserção foi significativamente maior no grupo onde foi feita a RAR seguida pela irradiação do laser e esse padrão se manteve em todos os periodos avaliados. Embora estudos clínicos com esse laser sejam escassos, inúmeros trabalhos in vitro comprovam a eficácia e segurança deste laser em remover cálculo das superfícies radiculares, eliminar bactérias, estimular a atividade celular e promover maior reparo e formação óssea sem causar carbonização, derretimento ou necrose nos tecidos irradiados^{33, 53, 66, 72, 91}. Mesmo diante de tantas características promissoras, não existe na literatura estudos in vivo avaliando a influência deste laser no tratamento de

doença periodontal induzida e nos processos de reparo ósseo associados a um importante fator de risco: o cigarro.

2 Proposição



2 Proposição

Hipótese

A aplicação do laser de Er,Cr:YSGG quando da utilização de nicotina/tabagismo poderia interferir nos resultados do tratamento da doença periodontal e na reparação óssea.

Objetivos Específicos

Objetivo I - Avaliar as influências do laser Er,Cr:YSGG no tratamento de doença periodontal induzida em ratos submetidos a inalação de fumaça de cigarro, por meio das análises histomorfométrica e imuno-histoquímica.

Objetivo II – Avaliar as influências do laser Er,Cr:YSGG na criação de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos submetidos a inalação intermitente de fumaça de cigarro.

3 Material e Método



3 Material e Método

Estudo I – Avaliar as influências do laser de Er,Cr:YSGG no tratamento de doença periodontal induzida em ratos submetidos a inalação de fumaça de cigarro.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, de acordo com os regulamentos exigidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (ANEXO 1). Neste estudo foram utilizados 180 ratos (*Rattus Norvegicus*), variação *albinus*, *Holtzman*, adultos, pesando em média 300g, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP onde foram alimentados com ração sólida e com acesso a água *ad libitum*, antes e durante todo o período experimental.

3.1 Inalação da fumaça de cigarro

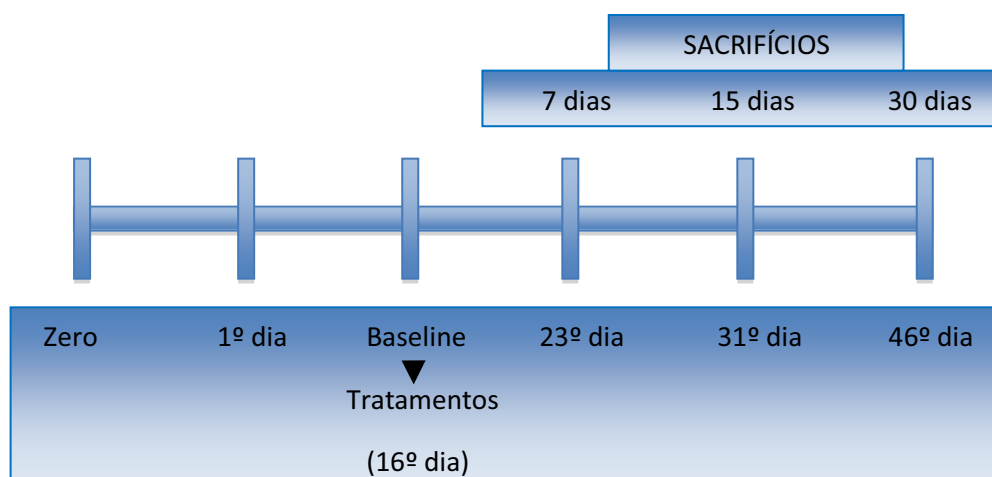
Um total de 90 animais foi submetido a inalação de fumaça de cigarro como anteriormente realizado nos trabalhos de Cesar-Neto et al.²¹ (2003) e Benatti¹¹ (2005). Foram confeccionadas caixas de vidro nas proporções de 45x25x20cm³, com um orifício em cada extremidade e dois compartimentos separados. Uma bomba de ar foi acoplada a um desses orifícios para permitir o fluxo de ar contínuo dentro da caixa. Em um dos compartimentos, foram colocados 10 cigarros (1.3mg de nicotina cada) e no outro 5 animais foram alojados para inalação da fumaça gerada por esses cigarros durante 8 minutos. Esse experimento foi repetido 3 vezes ao dia, com um intervalo de aproximadamente 5 horas entre cada período (Figura 1). A duração do tempo de exposição a fumaça de cigarro variou de acordo com cada período experimental avaliado, sendo constante até o dia de sacrifício de cada animal. No dia seguinte ao início da inalação os animais foram submetidos a indução da doença periodontal

Figura 1 – Ilustração da metodologia utilizada durante a inalação de fumaça de cigarro



3.2 Indução da doença periodontal

Os animais foram anestesiados por uma combinação de Cloridrato de Quetamina e Cloridrato de Xilazina nas seguintes proporções: 0,08 ml/100g e 0,04 ml/100g de massa corporal, respectivamente. Em seguida, os animais foram colocados em uma mesa operatória que possibilitou a retração da boca e o livre acesso a região maxilar e dessa forma, ligaduras (fios de algodão, nº 24) foram inseridas na região subgingival ao redor dos segundos molares superiores. A inserção dos fios foi feita com o auxílio de duas pinças hemostáticas e sondas clínicas no tamanho infantil. Após um período de indução de 15 dias, as ligaduras foram removidas e os tratamentos imediatamente realizados. Observando a linha do tempo descrita abaixo é possível visualizar as fases do experimento.



Os animais foram então divididos em 6 grupos, com 10 animais cada e avaliados em três períodos experimentais: 7, 15 e 30 dias.

Grupo FRAR (Fumante Raspagem) – Inalação intermitente de fumaça de cigarro e indução da doença periodontal. No momento da remoção da ligadura foi realizado o procedimento de raspagem e alisamento radicular (RAR). A instrumentação mecânica foi feita por um profissional previamente treinado por meio de curetas modelo mini five– Gracey 7-8, 11-12 e 13-14 (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA).

Grupo FL (Fumante Laser) - Inalação intermitente de fumaça de cigarro e indução da doença periodontal. No momento de remoção da ligadura os dentes foram irradiados com o laser. O laser utilizado foi o Er,Cr:YSGG (erbio, cromo: ítrio, scandio, galio, garnet - Waterlase YSGG, BIOLASE Technology, Irvine, CA, USA) com tamanho de onda de 2.78 μm e ponta de safira (G4; diâmetro de 600 μm ; tamanho de 4mm; fator de transmissão de 100%), com potência de 1.0 W e frequência de 20 Hz (140-150 μs) e irrigação com 10% de ar e 15% de água (29.99 J/cm²/pulse). Para a aplicação, a ponta do laser foi angulada externamente em torno de 15 graus com a superfície do dente, com um tempo de irradiação de 30 segundos nas regiões vestibular (15 segundos) e lingual (15 segundos) ⁷².

Grupo FRAR+L (Fumante RAR+Laser) – Inalação intermitente de fumaça de cigarro, indução da doença periodontal e procedimentos de raspagem e alisamento radicular (como no Grupo FR) seguido pela irradiação com o laser (como no Grupo FL).

Grupo RAR (Raspagem) - Realizada indução da doença periodontal, procedimento de raspagem e alisamento radicular após remoção da ligadura (como descrita no Grupo FR);

Grupo L (Laser) - Indução da doença periodontal e tratamento com irradiação do laser Er,Cr:YSGG nos mesmos parâmetros já relatados para o grupo FL.

Grupo RAR+L (RAR+Laser)- Indução da doença periodontal e tratamentos com raspagem e alisamento radicular (como no Grupo FR) associada a posterior irradiação com o laser Er,Cr:YSGG (como no Grupo FL).

Os animais foram submetidos a eutanásia com sobredose anestésica nos períodos de 7, 15 e 30 pós tratamentos. A hemimaxila de cada animal foi removida e dividida em duas amostras, uma delas foi submersa em paraformaldeído tamponado 4% durante 48 horas para processamento laboratorial adequado e posterior análises histológica/histométrica e imuno-histoquímica. Na outra hemimaxila o colar gengival ao redor do segundo molar foi removido e imediatamente colocado em nitrogênio líquido durante a coleta e em seguida congelado a - 80°C para análise pela técnica de PCR-Tempo real.

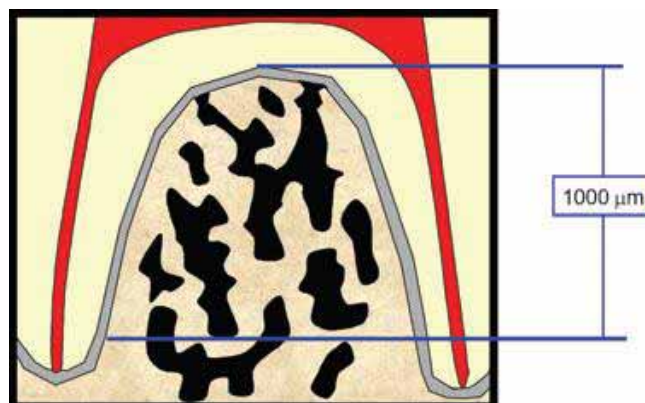
3.3 Análise histológica/histométrica

Após a fixação das peças em paraformaldeído a 4 %, estas foram lavadas em água corrente por 12h e colocadas em solução de ácido etilendiamino tetra-acético a 7% (EDTA) para descalcificação por um período de 8 semanas, com trocas semanais.

Na sequência foram lavadas e desidratadas em álcool, diafinizadas em xilol e incluídas em parafina. Os cortes foram realizados no sentido mesio-distal ao longo eixo do dente com 4µm de espessura e então corados pela técnica de hematoxilina-eosina

(HE). Utilizando um microscópio óptico Diastar (Leica Reichert & Jung products, Germany), foram avaliadas as reações inflamatórias do tecido conjuntivo e os processos de reabsorção óssea da região de furca dos segundos molares superiores. Para a análise histométrica, um examinador cego e calibrado selecionou 3 lâminas de cada animal, correspondentes ao início, meio e final de cada amostra. Utilizando o analisador de imagens Image J (National Institutes of Health, USA), a área da região de furca foi delimitada de acordo com César-Neto et al. ²⁰. Dessa forma, para obter o limite apical da imagem, verticalmente foi traçado uma linha a partir do teto da furca até a distância de 1000 μm e os limites mesio/distal foram obtidos utilizando as raízes mesial e distal do segundo molar. Dessa forma, a área total da região de furca e a área óssea alveolar foram mensuradas e os valores obtidos convertidos em porcentagem de tecido ósseo presente na região avaliada (Figura 2).

Figura 2 – Delimitação da região de furca. Fonte: Cesar Neto et al. ²⁰ (2006)



3.4 Análise imuno-histoquímica

Essa análise foi feita apenas nas amostras do período de 7 dias e para isso, foram realizados testes para identificar e localizar a expressão das proteínas fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP), e do ligante do ativador do receptor de fator kappa B

nuclear (RANKL). Cortes histológicos de 4 μ m de espessura foram obtidos e confeccionadas lâminas silanizadas, seguido de tramitação laboratorial de rotina e então submetidos ao bloqueio dos epítomos inespecíficos através da aplicação de peróxido de hidrogênio 3% por 30 minutos e da proteína bovina albumina (BSA 3%) por 120 minutos. Logo após, os cortes foram incubados por 12 horas nos anticorpos primários nas seguintes concentrações: TRAP- 1:100; RANKL- 1:200. Como controle negativo, foram aplicados sobre os cortes histológicos IgG normal (R&D Systems), em substituição aos anticorpos primários, nas mesmas diluições destes. Em seguida, os cortes foram tratados pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) com o kit ABC Staining System (sc-2023, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) segundo as instruções do fabricante e no final da reação, foi realizada a contra coloração com solução de hematoxilina de Harris para visualização dos núcleos. As análises das marcações foram feitas por um examinador cego e calibrado que delimitou duas áreas distintas da região de furca: uma entre a bifurcação e o tecido ósseo (tecido conjuntivo) para avaliar a marcação do RANKL e outra na superfície óssea presente na furca para visualizar as células marcadas pelo TRAP. Em seguida foram realizadas descrições dos tipos celulares marcados positivamente.

3.5 PCR-Tempo Real

O RNA total foi extraído a partir de amostras de tecido, utilizando o kit RNAqueous 4PCR, de acordo com o protocolo do fabricante (Ambion). A quantidade e a pureza do RNA total foram determinados em um espectrofotômetro (NanoVue), avaliando-se a absorbância a 260 nm e a proporção 260/280 nm, respectivamente. Seguindo o protocolo do fabricante, a síntese do DNA complementar (cDNA) foi feita por reação de transcrição reversa (RT) com o kit *TaqMan Reverse Transcription*

Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando 400 ng de RNA total na presença de Oligo (dT), enzima de transcriptase reversa, MgCl₂, dNTPs e inibidor de RNAase. Para reação de PCR-tempo real foram utilizados: 1 µL do produto da reação de RT, 8 ml de água livre de nuclease, 10 mL de TaqMan 2x PCR MasterMix (Applied Biosystems) e 1 µL de *TaqMan Gene Expression Assay* incluindo, os primers e as sondas conjugadas (Applied Biosystems) para os genes alvo do rato (FGFb1 - NM_019305.2; VEGFa - NM_031836.2; GAPDH - NM_017008.3). A reação de PCR-tempo real (qPCR) foi feita utilizando a máquina Step One Real Time PCR System em ciclos previamente padronizados (o número de ciclos foi otimizado para cada gene alvo, baseado no *cycle threshold* para detecção do sinal de cada gene) A expressão gênica dos genes alvo foi normalizada pela expressão do gene constitutivo GAPDH e quantificada pelo método de quantificação relativa, em comparação à expressão das amostras controle, utilizadas como valor de referência.

3.6 Análise estatística

Para análise estatística foram aplicados os testes de Shapiro Wilk para avaliação da normalidade dos dados e os testes de Anova complementado pelo teste de Bonferroni para verificar as diferenças entre os tratamentos dentro de cada período de avaliação. Para avaliar a diferença entre os animais expostos a fumaça de cigarro e os não expostos de acordo com cada tratamento e período de avaliação, o teste t-não pareado foi utilizado. Todos os testes foram aplicados com nível de significância de 95% ($p < 0.05$). O programa Graphpad 5.0 foi utilizado para realização das análises estatísticas desse estudo.

Estudo 2 -Avaliação das influências do laser Er,Cr:YSGG na criação de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos submetidos a inalação intermitente de fumaça de cigarro

Para realização desse estudo, foram utilizados 100 animais, (*Rattus Norvegicus*), variação *albinus*, *Holtzman*, adultos, pesando em média 300g, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP onde foram alimentados com ração sólida e com acesso a água *ad libitum*, antes e durante todo o período experimental.

Um total de 50 animais foi submetido a inalação intermitente de fumaça de cigarro da mesma maneira que foi realizada no Estudo I. Uma semana após o início da exposição foram criados defeitos ósseos críticos na região de calvária.

3.7 Procedimentos cirúrgicos

Todos os animais foram anestesiados por associação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 0,08 ml/100g de massa corporal (Cloridrato de Quetamina) e 0,04 ml/100g de massa corporal (Cloridrato de Xilazina).

Foi realizada a tricotomia na região da calota craniana seguida de anti-sepsia do campo cirúrgico com gaze estéril, embebida em solução de povidine. O animal foi posicionado em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica e com o auxílio de um cabo para bisturi com lâmina intercambiável nº 15 foi realizada uma incisão ântero-posterior cutânea e muscular, com aproximadamente 5 mm de extensão, permitindo a exposição do perióstio. Em seguida, os tecidos foram divulsionados utilizando uma tesoura pequena com a extremidade romba e uma pinça de dissecação, até a exposição do perióstio, sendo este incisado e removido com o mesmo tipo de lâmina, permitindo desta forma a exposição do tecido ósseo. Os defeitos foram realizados seguindo uma

distribuição randomizada e divididos em 4 grupos (5 animais por grupo), avaliados nos períodos experimentais de 0, 7, 15, 30 e 60 dias.

GRUPO FT (GFT) – Os animais foram submetidos a inalação intermitente de fumaça de cigarro e os defeitos críticos circulares localizados na porção mediana da calota foram feitos utilizando uma fresa trefina (Dentoflex, São Paulo, Brasil) com 8 mm de diâmetro externo, montada em contra-ângulo (Anthogyr – Injecta – Diadema, Brasil) com redução de 16:1, acoplado em motor para implante (BML 600 Plus Driller -CK Driller – Brasil), com 1500 rpm, sob irrigação constante com solução salina. Os defeitos tinham 8 mm de diâmetro e aproximadamente 1,5 mm de espessura.

GRUPO FL (GFL) - Os animais foram submetidos a inalação intermitente de fumaça de cigarro e os defeitos críticos com 8 mm de diâmetro foram criados utilizando o laser de Er,Cr:YSGG (erbio, cromo: ítrio, escândio, gálio, garnet - Waterlase YSGG, BIOLASE Technology, Irvine, California, USA) nos seguintes parâmetros: ponta de safira G4 (diâmetro de 600µm; tamanho de 4mm; fator de transmissão de 100%) posicionada perpendicularmente sem contato com a região da calvária, potência de 3.0 W, frequência de 20 Hz e irrigação com 10% de ar e 30% de água.

GRUPO T (GT) - Confeção de defeito ósseo crítico em calvária por meio do uso de fresa trefina (como realizada no grupo I).

GRUPO L (GL) – Foi criado defeito ósseo crítico na região de calvária, por meio da aplicação do laser Er,Cr:YSGG (como feito no grupo II).

Após as cirurgias os animais receberam analgésico (Paracetamol, Medley, Brasil) por gavagem na proporção de 50 ml para cada 100g de peso corporal.

3.8 Processamento histológico

Dentro de cada período de avaliação, os animais foram submetidos a eutanásia com sobredose dos anestésicos utilizados, e utilizando tesouras e alicate de corte, a porção superior da calvária foi completamente removida com os tecidos moles e duros. As peças foram fixadas em paraformaldeído tamponada a 4% durante 48 horas. Na sequência, as peças foram lavadas e imersas em EDTA 7% para início do processo de descalcificação por um período de 8 semanas, sendo realizados três trocas semanais. Em seguida foram lavadas e desidratadas em álcool, diafinizadas em xilol e incluídas em parafina. A inclusão das peças foi realizada por meio de uma inclusora Histo Embedder (Leica Reichert & Jung Products). Cortes seriados com 4 μm de espessura foram obtidos e adequadamente preparados para posterior análise histomorfométrica e reação de imuno-histoquímica.

3.9 Análise histológica e histométrica

Para avaliação histológica, os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (H&E) e por meio de microscópio óptico Diastar (Leica Reichert & Jung products, Germany) um examinador cego para os grupos e períodos selecionou as lâminas correspondentes a parte central do defeito e avaliou o contorno geral do defeito criado, assim como suas bordas e delimitações, possível presença de células inflamatórias, osteoblastos, osteoclastos, fibroblastos e características de neoformação óssea.

A análise histométrica foi feita utilizando as mesmas lâminas histológicas que representavam o centro do defeito crítico. Por meio do programa de análise de imagens Image J (Image J Launcher, 1.37b) foram realizadas medidas do comprimento dos

defeitos, a partir da distância linear entre as bordas dos mesmos. Essas medidas foram realizadas 3 vezes com um intervalo de uma semana entre cada uma delas e a partir dos dados obtidos em milímetros (mm), realizou-se a estatística.

3.10 Análise estatística

Os dados desse estudo foram numéricos e devido a isso o teste de Normalidade de Shapiro-Wilk foi aplicado para verificar se os dados se distribuíam de acordo com o teorema da distribuição central. Foi observado que os dados estavam de acordo com a normalidade ($p > 0.05$) e dessa forma testes paramétricos foram utilizados. O teste t-não pareado foi aplicado para avaliar a diferença entre os grupos laser e trefina em cada período de tempo, enquanto que o Anova complementado pelo teste de Bonferroni foi utilizado para avaliar a evolução temporal do reparo ósseo que ocorreu dentro de cada tratamento para os animais expostos ou não a inalação de fumaça de cigarro. Todos os testes foram aplicados com nível de confiança de 95% ($p < 0.05$).

4 Capítulo 1



Treatment of periodontal disease with an Er,Cr:YSGG laser in rats exposed to cigarette smoke inhalation*

Abstract

Background and Objective: Lasers have been widely used in periodontal therapy and more information about the effects of these devices in the tissues needs to be clarified. The aim of this study was to evaluate the use of the erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet (Er,Cr:YSGG) laser in the treatment of induced periodontitis in rats exposed to cigarette smoke inhalation (CSI). **Materials and Methods:** Ligatures were placed in the subgingival region of the maxillary second molar. After a 15-day period, the ligatures were removed and 180 animals were randomly divided into 6 groups: 1) the CSRP group was exposed to CSI and treated with manual scaling and root planing (SRP); 2) the CL group was exposed to CSI and Er,Cr:YSGG laser irradiation; 3) the CSRP+L group was exposed to CSI and treated with manual SRP followed by Er,Cr:YSGG laser irradiation; 4) the SRP group was treated with manual SRP 5) the L group was treated with Er,Cr:YSGG laser irradiation; 6) the SRP+L group was treated with manual SRP followed by Er,Cr:YSGG laser irradiation. Next, 7, 15 and 30 days after the treatments, the animals were sacrificed and histologic, histometric, immunohistochemistry and real-time PCR analyses were performed. **Results:** All groups showed similar histopathological characteristics during the evaluation periods. Histometrically, no differences were observed in the SRP, L and SRP+L, groups exposed to CSI. The CSRP group showed more bone formation at 30 days than at 15 days ($p < 0.01$), but less bone at 30 days than the CL group at 30 days ($p < 0.05$). Immunohistochemistry allowed for the visualization of cells characteristic of

*Artigo enviado a revista Lasers in Surgery and Medicine

osteoclasts, osteoblasts and fibroblasts. Real-time PCR showed more VEGF expression in the L ($p<0.05$) and SRP+L ($p<0.01$) groups at 30 days than at 15 days and less VEGF expression in the CSR group at 30 days than at 15 days ($p<0.05$). There was no difference in FGF expression in any of the groups or periods evaluated. **Conclusion:** Er,Cr:YSGG laser irradiation promotes favorable conditions for tissue repair even in animals exposed to CSI, with similar results as those achieved from manual scaling and root planing.

Key words: Laser therapy, ligature, nicotine, periodontitis, tissue repair

Introduction

The presence of a bacterial biofilm on tooth surfaces can trigger immune-inflammatory reactions in the periodontal tissues that support and protect the teeth, resulting in the development of periodontal diseases [1]. Systemic alterations, the presence of periodontopathogenic microorganisms and other underlying risk factors may modify the clinical characteristics and progression of these diseases [2,3]. Among these risk factors is cigarette smoking, which can adversely affect the clinical status of periodontal patients [4,5]. Case-controlled, cross-sectional and longitudinal studies have all shown that smokers have deeper probing depths, greater attachment loss, more bone loss, fewer teeth, a greater accumulation of supragingival calculus and lower rates of bleeding [6-13]. In addition to these modifications, smokers have a less favorable response to non-surgical and surgical periodontal treatments [14-16].

Faced with the challenge presented by periodontal patients who smoke, new therapeutic modalities have been studied. The high-intensity Er,Cr:YSGG (Erbium, Chromium, Yttrium, Scandium, Gallium, Garnet) laser can be used to improve the

clinical outcomes achieved thus far. In periodontics, this laser is used for incisions, osteotomies, gingivoplasty, hypersensitivity treatment and calculus removal [17-21]. In terms of calculus removal, the laser has been demonstrated to achieve results comparable to hand instruments and ultrasonic cleaning [22-24]. By developing a system that couples the light energy emission with a cooling air/water spray, this laser when properly adjusted does not cause harm or thermal damage, which could compromise tissue healing [25-28]. Thus, the aim of this study was to evaluate the use of the Er,Cr:YSGG laser for the treatment of induced periodontal disease in rats exposed to cigarette smoke inhalation.

Materials and methods

This project was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (protocol 12/2008). Forty adult male *Holtzman* rats (*Rattus norvegicus*) weighing an average of 300 g were used. The animals were kept in plastic cages under a 12:12 light-dark cycle at a controlled temperature (23 ± 2 °C) and humidity ($55 \pm 10\%$) with access to food and water *ad libitum* before and throughout the experimental period.

Cigarette smoke inhalation

Ninety animals were exposed to cigarette smoke inhalation in a device that consisted of a 45x25x20 cm³ glass chamber with 2 compartments: 10 cigarettes were placed in the first compartment (with 1.3 mg of nicotine each) and 5 animals were housed in the second compartment [29,30]. The smoke from these cigarettes was pumped into the chamber for 8 minutes. This experiment was repeated 3 times daily with an interval of 5 hours between each period. On the same day that cigarette smoke inhalation began, the ligatures were inserted.

Experimental periodontal disease

The animals were randomly selected, weighed and anesthetized with a combination of ketamine chloridrate (0.08 ml/100 g; Syntec, Sao Paulo, Brazil) and xylazine chloridrate (0.04 ml/100 g; Syntec, Sao Paulo, Brazil). The ligature model was randomly implemented by tying cotton ligatures into the subgingival region around the right and left maxillary second molars [31,32]. After a 15-day period, the ligatures were removed, and treatments were immediately performed [33].

Experimental groups

The animals were randomly assigned into 6 groups of 10 animals each. **Group CSRP (Cigarette Smoke and Scaling and root planing)**: Intermittent cigarette smoke inhalation was administered, and supra- and subgingival scaling and root planing was performed using manual curettes (n.7-8/mine five, 11-12/mine five and 13-14/mine five; Hu-Friedy, Co Inc., Chicago, IL, USA). **Group CL (Cigarette smoke and Laser)**: Cigarette smoke inhalation and laser dental surface irradiation were administered. The high-power Er,Cr:YSGG laser device was employed, emitting photons with a wavelength of 2.78 μm , a pulse duration of 140–200 μsec and a repetition rate of 20 Hz. The parameters used in this study were as follows: 1 W power, 10% air and 15% water irrigation, with a G4 tip (600 μm in diameter and 4 mm in length) and a transmission factor of 100%. The external irradiation of the root surface was performed in the direction of the gingival sulcus in the non-contact mode (2 mm distance). The total irradiation time was 30 seconds, with the vestibular and palatine regions each receiving 15 seconds of irradiation [33]. **Group CSRP+L (Cigarette Smoke and Scaling and root planing + Laser)**: Intermittent cigarette smoke inhalation. The animals underwent supra and subgingival scaling and root planing (just

as in Group CSRP) that was immediately followed by Er,Cr:YSGG laser surface irradiation (as performed in Group CL). **Group SRP (Scaling root planing)**: Supra- and subgingival scaling and root planing (SRP) was performed as described in the CSRP group. **Group L (Laser)**: Er, Cr: YSGG laser irradiation using the same parameters already reported for the CL group. **Group SRP+L (Scaling and root planing + Laser)**: Scaling and root planing (as in the CSRP group) was administered along with Er, Cr: YSGG laser irradiation (as in the CL group).

At 7, 15 and 30 days post-treatment, the animals were euthanized and the hemimaxillae of each animal was removed and divided into two samples. One sample was immersed in 4% paraformaldehyde buffered for 48 hours to render it suitable for further laboratory processing histological/immunohistochemical and histometric analysis. In the other sample, the gingival collar around the second molar was removed, immediately placed in nitrogen liquid, and frozen at - 80 ° C for subsequent real-time PCR analysis.

Histological and histometric analysis

After descalcification in 7% EDTA buffered, the samples were dehydrated embedded in paraffin. Histological serial sagittal sections with a thickness of 4 µm were stained with hematoxylin-eosin (HE). Using an optical microscope (DIASTAR Microscope, Leica Reichert & Jung products, Wetzlar, Hessen, Germany), a blinded examiner (AM) assessed the inflammatory reactions of the gingival connective tissue, periodontal ligament and bone resorption/repair processes present in the furcation area.

For the histometric analysis, a second blinded examiner (CRS) randomly selected three histological images from each tooth. The selected images corresponded to

the beginning, middle and end of each sample. The proportion of bone tissue in the furcation area was assessed using an image analyzer program (Image J Launcher 1.42q, Bethesda, Maryland, USA). The bone loss measurements were performed on each section three times by the same examiner within a 15-day interval. The analyzed area was then delimited as previously reported [33]. Thus, the furcation and alveolar bone areas were measured, and the resulting values were converted into the percentages of bone present in the evaluated region.

Immunohistochemistry analysis

This method was performed only during a 7-day post-treatment period and for the detection and localization of two osteoclast-related proteins: the receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). Histological sections of 4 μm in thickness were mounted on silanized slides (Fisher Superfrostplus). The tissues were treated with a complex avidin-biotin-peroxidase (ABC) using the ABC Staining System kit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The primary mouse antibodies of RANKL and TRAP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) were individually optimized using concentrations of 1:200 and 1:100, respectively. As a negative control, the sections were treated with standard IgG in the same concentration as the primary antibodies in the experimental conditions (R&D System Biotechnology, Minneapolis, MN, USA). The slides were then counter-stained with Harris Hematoxylin to visualize the nucleus. The analysis was made by a blinded and calibrated examiner (PSC) who delineated two distinct areas of the furcation region: one between the furcation roof and the bone tissue (connective tissue) to evaluate the labeling of RANKL in the bone surface and the other

in the furcation to view the labeled cells by TRAP. Then, descriptions of the positively marked cell types were performed.

Real-time PCR analysis

Total RNA was extracted from the tissue samples using the RNAqueous 4PCR kit, according to the manufacturer's protocol (Ambion, Life Technologies). The quantity and purity of the total RNA were determined on a Nanovue spectrophotometer by evaluating the absorbance at 260 nm and the 260/280 nm ratio, respectively. Complementary DNA was synthesized through the reverse transcription of 400 ng of total RNA in the presence of Oligo (dT), reverse transcriptase enzyme, MgCl₂, dNTPs, RNase inhibitor, according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). Real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed using a StepOne thermocycler (Applied Biosystems). The reaction included 1 mL of the RT reaction product in 20 mL of PCR reaction mix that included: 8 mL of nuclease-free water, 10 mL of TaqMan qPCR master mix and 1 mL of TaqMan gene expression assays, including forward, reverse primers and fluorophore-conjugated probe (Applied Biosystems) for target mouse genes (FGFb1 - NM_019305.2; VEGFa - NM_031836.2; GAPDH - NM_017008.3). The real-time PCR reaction was carried out under optimized and standardized cycling conditions in the Step One Real-Time PCR System. The relative levels of gene expression were determined using the cycle threshold method and were normalized to the housekeeping gene GAPDH. The results are represented as the mean mRNA expression from duplicate measurements, as normalized by internal GAPDH control.

Statistical analysis

The data were statistically analyzed using Graph Pad Prism 5 software (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). The Shapiro Wilk test was used to assess the normality of the data and ANOVA tests with Bonferroni post-hoc comparisons were applied to each evaluation period. To find the difference between animals exposed and not exposed to cigarette smoke in each treatment and evaluation period, the paired t-test was used. All tests were applied with a significance level of 95% ($p < 0.05$).

Results

Descriptive histological analysis

Similar histopathological characteristics during the stages of tissue healing were observed in the furcation area among the groups. At 7 days post-treatment, it was possible to visualize the presence of moderate inflammatory infiltrate, a disorganization of the connective tissue and partial alveolar bone filling in the furcation area (Figures 1 A, B, C, D, E, F). Fifteen days post-surgery (Figures 1 G, H, I, J, K, L), the presence of a few inflammatory cells was observed, and the connective tissue was more organized with dense collagen fibers and numerous blood vessels with varying diameters. The bone tissue was in healing process, surrounded by osteoblasts and osteocytes. At 30 days (Figures 1 M, N, O, P, Q, R), the inflammatory infiltrate was scarce in the area below the bifurcation area, and the organized connective tissue was composed of dense collagen fiber bundles inserted into the bone and interspersed with fibroblasts; the bone tissue was filling either partially or totally in the furcation region with numerous reversal lines. These lines featured bone formation, and the osteoblasts lined up around the newly formed alveolar bone.

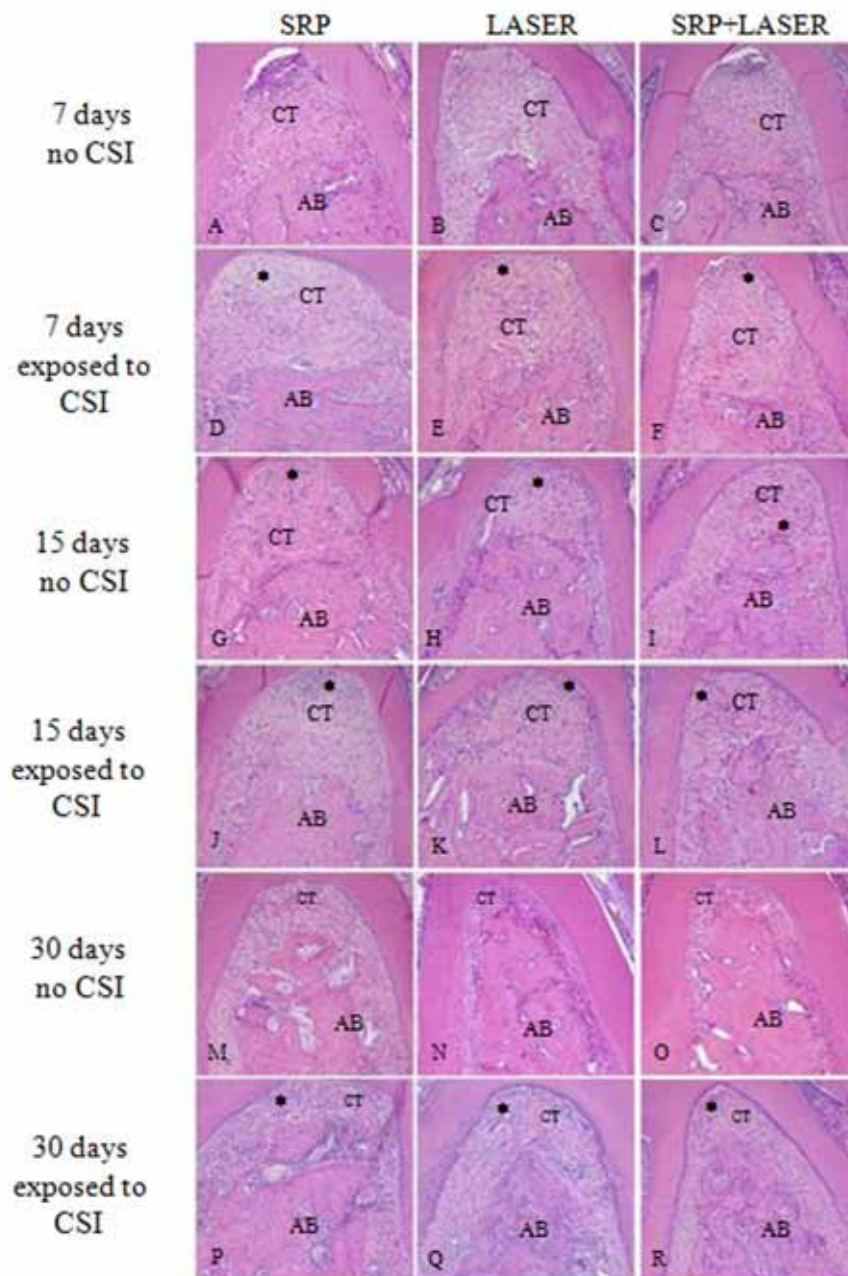


Figure 1 – Photomicrograph of the upper second molars of animals exposed or not exposed to cigarette smoke. At 7 days, the presence of inflammatory infiltrate, disorganized connective tissue and bone tissue resorption can be observed. At 15 days, few inflammatory cells can be observed, and the tissue is more organized with more apparent bone formation. At 30 days, scarce inflammatory infiltrate was visible, and the connective tissue was well organized with systematically oriented fibers. Newly formed alveolar bone filled the region of bifurcation. Asterisk - inflammatory infiltrate, CT -

connective tissue, AB - alveolar bone tissue. (Stained by H&E, original magnification 10x).

Histometric analysis

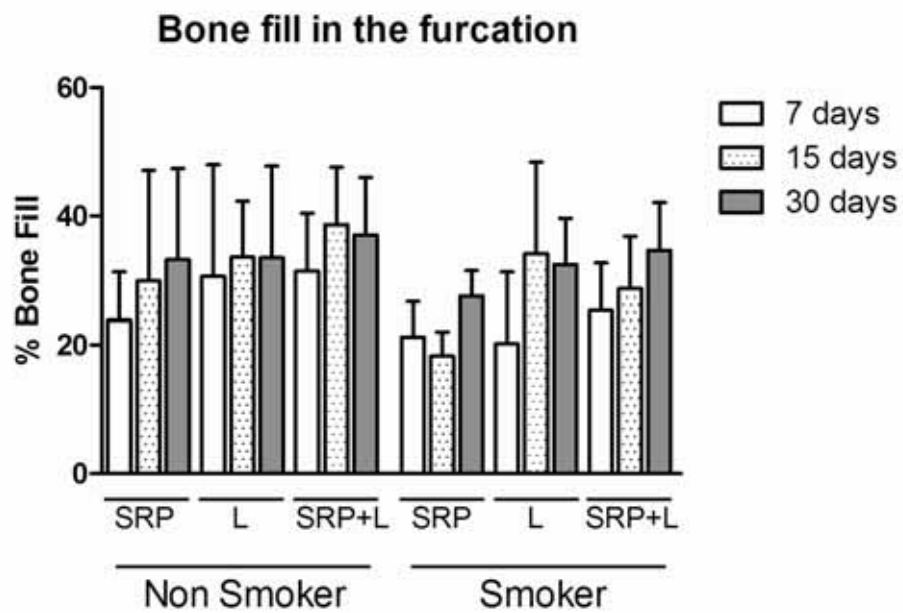
In the groups of animals not exposed to cigarette smoke inhalation (SRP, L and SRP+L), no statistically significant differences were observed among treatments at any of the time periods assessed. Additionally when the evaluation periods were compared for the same treatment, no significant differences were observed. The animals subjected to cigarette smoke inhalation, it was found that at 15 days the SRP group showed less bone area compared to Laser group ($p < 0.05$). When evaluating the percentage of bone area present in the furcation area over the study periods, it was found that only the SRP smoker group showed statistically bone formation at 30 days compared to 15 days ($p < 0.01$). The comparison between non-smoker and smoker groups showed no significant difference between treatments and periods evaluated. Table 1 shows the means and standard deviations of alveolar bone in the furcation area (%) of all treatments and periods evaluated (Graphic 1).

Table 1 – Means and standard deviations of bone tissue percentage in furcation area of all groups and periods.

	SRP		LASER		SRP+ LASER	
	Non-smoker	Smoker	Non-smoker	Smoker	Non-smoker	Smoker
7 days	23.78±7.49	21.22±5.43	30.59±17.36	20.16±11.11	31.38±9.03	25.30±7.36
15 days	29.89±17.18	18.25±3.79*##	33.56±8.71	34.12±14.27*	38.61±8.95	28.68±8.12
30 days	33.18±14.19	27.54±3.91##	33.48±14.28	32.43±7.22	37.03±8.96	34.63±7.43

* $p < 0.05$ - Teste de Anova complementado pelo teste de Bonferroni.(Intergroup)

$p < 0.01$ - Teste de Anova complementado pelo teste de Bonferroni (Intragroup)



Graphic 1 - Mean and standard deviation of bone tissue area present in the furcation region in all treatment groups at 7, 15 and 30 days post-treatment.

Immunohistochemistry analysis

The results showed that the 7-day period was positively stained in all groups evaluated for both antibodies (TRAP and RANKL). These markings were visualized in the cells surrounding the alveolar bone tissue in the furcation area, suggesting the presence of cell types such as osteoclasts, osteoblasts and fibroblasts (Figures 2A, B, C, D, E, F).

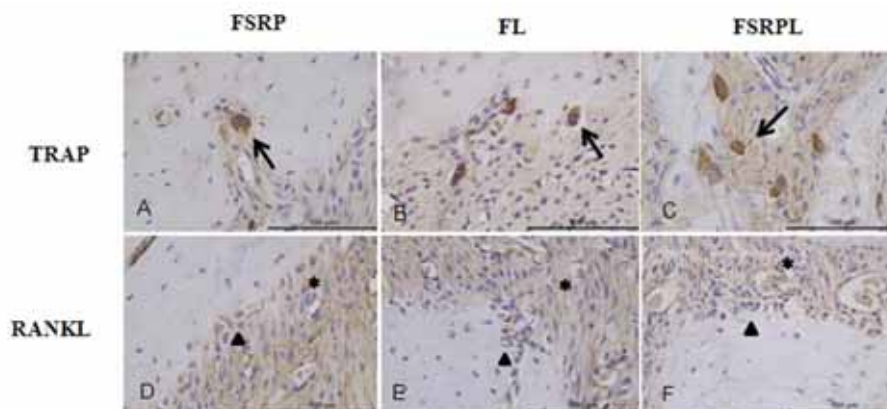
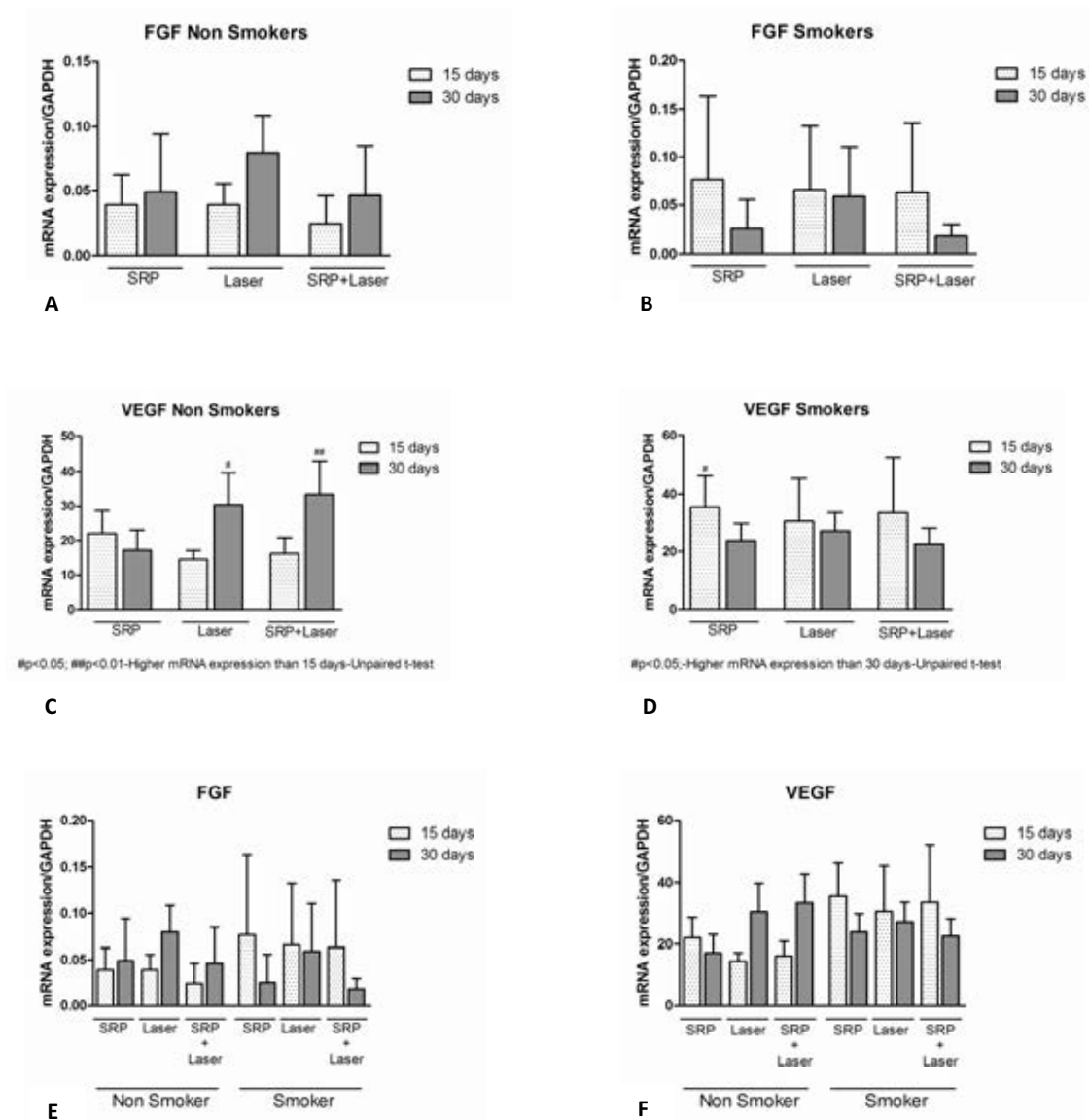


Figure 2 – Micrograph of portions of the alveolar bone tissue in the furcation area of upper second molars in 7 days groups FRAR, FL, FRL. Note the positive staining for TRAP antibody in the multinucleated cells, characterized as osteoclasts (arrows) that are present in all groups (Figs. A, B and C). In D, E and F, it is possible to verify positive immunostaining for RANKL in osteoblastic cells (triangle) and fibroblasts (asterisk) interspersed between the connective fibers bone (Immunohistochemical staining, original magnification 40x).

PCR-Tempo Real

The comparison between the animals exposed to cigarette smoke inhalation and those who were not exposed showed no significant differences in the expression of mRNA for VEGF and FGF between the treatments and across the periods evaluated (Graphic 2 E, F). The intragroup analysis showed that in the animals not exposed to cigarette smoke inhalation, there was an increase in VEGF mRNA expression in the L and SRP+L groups within 30 days compared to 15 days ($p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively) (Graphic 2C). In animals exposed to cigarette smoke, a difference in the VEGF mRNA expression was only observed in the CSR group, in which the expression was significantly lower after 30 days than after 15 days ($p < 0.05$). Additionally, the FGF mRNA expression showed no significant differences between any of the comparisons (Graphic A, B, E).



Graphic 2 - Means and standard deviations for the fold-changes of mRNA expression of VEGF and FGF relative to the normalized gene GAPDH standards

Discussion

Cigarette smoking is one of the most important risk factors for periodontal disease, and many studies have shown that smoking negatively influences the progression and development of such diseases, changing the clinical symptoms and prognosis after basic and surgical periodontal treatment [4,8,11,12,16,34]. The aim of this study was thus to evaluate the influence of Er,Cr:YAGG on the treatment of induced periodontal disease in rats exposed to cigarette smoke inhalation. We predicted a clinical benefit to using the erbium laser as an alternative and/or adjunct treatment to manual scaling and root planing that could improve the healing and repair of periodontal tissues even in the presence of the cigarette smoke. Analysis of histopathological images showed that there was a gradual increase in the tissue repair observed throughout all the periods and groups, with connective tissue organization, decreased inflammatory infiltrate and new bone formation characterized by the presence of numerous lines of reversal. These results indicate that both SRP and the Er,Cr:YSGG were able to remove the bacterial biofilm, decontaminate the root surface and stimulate tissue healing. Other *in vitro* studies, such as those by Ting in 2007 [18] and Hakki in 2010 [35], have also shown the ability of this laser to remove calculus from root surfaces without causing tissue damage. Tsurumaki et al. (2011) [36] showed that the Er,Cr:YSGG laser does not produce morphological changes in the irradiated root surfaces and was able to promote adhesion of blood components, which is consistent with those obtained by mechanical instrumentation performed with curettes. In addition to the mechanical action produced by this laser, our results can also be attributed to the bactericidal effect of the laser in removing the bacteria through a process known as ablation. In 2011, Akiyama et al. [37] evaluated the Er:YAG ablation mechanism in

colonies of *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) with scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Their results showed that laser irradiation produced an ablation spot with two different areas in relation to the non-irradiated colonies. The authors concluded that the Er:YAG laser promoted ablation in the colonies of periodontal bacteria through a thermal vaporization process. No study using the same methodology has been performed with the Er,Cr:YSGG laser; however, because these devices belong to the same laser family and have similar wavelengths and mechanisms of action, it is believed that they may have the same effect on bacteria. Furthermore, other *in vitro* studies have demonstrated that the Er,Cr:YSGG laser is able to decontaminate root surfaces [38-40]. The histometric data revealed no significant differences between the three types of treatments performed, indicating that the effects of this laser are similar to those of scaling and root planing. Many studies have examined the effects of lasers in periodontal therapy, as demonstrated by Schwarz et al. (2008) [17] in a systematic review. An analysis of the clinical studies shows that lasers can be safely used in the treatment of periodontal disease, improving clinical indices such as probing depth, attachment level, bleeding index and mobility, and reducing the load of periodontal bacteria. The same research group, in another systemic review observed that histological and immunohistochemistry analysis from *in vivo* studies showed that laser irradiation can decrease inflammation and stimulate new cementum and bone formation [41,42]. These finding was also observed in the present study.

Among the greatest challenges of periodontal therapy is the stimulation of tissue and periodontal regeneration with the proper orientation of periodontal ligament fibers accompanied by the new cementum and bone formation. To evaluate the alveolar bone in the furcation region of this study, immunohistochemical reactions were made for

locating and marking two proteins associated with bone turnover: RANKL (the ligand activator of nuclear factor kappa beta receptor) and TRAP (tartrate resistant acid phosphatase). Our results show positive staining of multinucleated cells (osteoclasts) surrounding the bone surface and other cell types present in the connective tissue (osteoblasts and mesenchymal cells) in all groups. This may indicate intense activity in the processes of bone resorption and neoformation. High-intensity lasers influence bone metabolism through a mechanism that still remains unknown; however, studies have proven that they can stimulate bone formation and repair [20,42,43].

It is important to consider that the healing process of periodontal tissues involves the activation of numerous cellular and molecular mechanisms that are regulated by the release of various chemical mediators. Accordingly, this study evaluated two growth factors related to tissue regeneration: VEGF, which is present in different cell types and is responsible for angiogenesis, and FGF, which is capable of stimulating the proliferation of fibroblasts, osteoblasts and mesenchymal stem cells and also stimulates the formation of new blood vessels. Our results showed that in the groups of animals not subjected to cigarette smoke inhalation, the mRNA expression was higher for both markers (except for VEGF in the SRP group). However, this difference was significant only for the VEGF in L and the SRP+L groups at 30 days compared to 15 days. These results indicate that in addition to not interfering with VEGF and FGF expression, this laser can stimulate the formation of new blood vessels and thereby promote tissue repair. Importantly, the expression of VEGF is strongly associated with the healing stages of periodontal disease [44]. Moreover, all groups of animals exposed to cigarette smoke showed a decrease in their expression levels of VEGF and FGF. However, among the treatment groups, only the SRP group demonstrated a significant difference

in the level of VEGF expression at 30 days compared to 15 days. These results may be related to the methodology of exposure to cigarette smoke because the concentration of nicotine obtained in this study is considered toxic and adversely affects angiogenesis and the recruitment/metabolism of cells involved in tissue healing and repair, including fibroblasts, osteoblasts, monocytes and endothelial cells [30,42,45,46].

One of the major disadvantages of laser irradiation is that its improper use can have harmful effects on soft and hard tissues, such as melting, charring and necrosis. To avoid this, laser parameters such as the power, air/water ratio, application time and frequency need to be adequately standardized. The results of this study suggest that the parameters used here were properly adjusted and the laser irradiation did not damage the root surface and provided favorable conditions for tissue repair in the furcation area.

Conclusion

This study demonstrates that the use of the Er, Cr: YSGG laser, either by itself or in combination with root scaling, promoted favorable conditions for tissue repair even in animals exposed to cigarette smoke. The use of the laser produced similar results as manual scaling and root planing.

Acknowledgement

This study was financially supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP - processes numbers 2009/17639-9 and 2010/16661-8, São Paulo, Brazil) and the Coordination for the Improvement of Higher Educated Personnel (CAPES, Brasilia, DF, Brazil).

References

1. Williams RC. Periodontal disease. *N Engl J Med* 1990; 322(6):373-382.
2. van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 2002; 29(11):1023-1028.
3. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992; 63(4 Suppl):322-331.
4. Bergstrom J. Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 1989; 17(5):245-247.
5. Solomon HA, Priore RL, Bross ID. Cigarette smoking and periodontal disease. *J Am Dent Assoc* 1968; 77(5):1081-1084.
6. Baljoon M, Natto S, Bergstrom J. Long-term effect of smoking on vertical periodontal bone loss. *J Clin Periodontol* 2005; 32(7):789-797.
7. Natto S, Baljoon M, Bergstrom J. Tobacco smoking and periodontal bone height in a Saudi Arabian population. *J Clin Periodontol* 2005; 32(9):1000-1006.
8. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *J Clin Periodontol* 2001; 28(4):283-295.
9. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* 2001; 28(5):377-388.

10. Thomson WM, Broadbent JM, Welch D, Beck JD, Poulton R. Cigarette smoking and periodontal disease among 32-year-olds: a prospective study of a representative birth cohort. *J Clin Periodontol* 2007; 34(10):828-834.
11. Torrungruang K, Nisapakultorn K, Sutdhibhisal S, Tamsailom S, Rojanasomsith K, Vanichjakvong O, Prapakamol S, Premsirinirund T, Pusiri T, Jaratkulangkoon O, Kusump S, Rajatanavin R. The effect of cigarette smoking on the severity of periodontal disease among older Thai adults. *J Periodontol* 2005; 76(4):566-572.
12. Bergstrom J, Eliasson S. Noxious effect of cigarette smoking on periodontal health. *J Periodontal Res* 1987; 22(6):513-517.
13. Gomes SC, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CI, Mutters R, Marcantonio RA. Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. *J Periodontol* 2006; 77(9):1483-1490.
14. Wan CP, Leung WK, Wong MC, Wong RM, Wan P, Lo EC, Corbet EF. Effects of smoking on healing response to non-surgical periodontal therapy: a multilevel modelling analysis. *J Clin Periodontol* 2009; 36(3):229-239.
15. Kaldahl WB, Johnson GK, Patil KD, Kalkwarf KL. Levels of cigarette consumption and response to periodontal therapy. *J Periodontol* 1996; 67(7):675-681.
16. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD, Molvar MP, Dyer JK. Long-term evaluation of periodontal therapy: I. Response to 4 therapeutic modalities. *J Periodontol* 1996; 67(2):93-102.

17. Schwarz F, Aoki A, Becker J, Sculean A. Laser application in non-surgical periodontal therapy: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2008; 35(8 Suppl):29-44.
18. Ting CC, Fukuda M, Watanabe T, Aoki T, Sanaoka A, Noguchi T. Effects of Er,Cr:YSGG laser irradiation on the root surface: morphologic analysis and efficiency of calculus removal. *J Periodontol* 2007; 78(11):2156-2164.
19. Al-Omari WM, Palamara JE. Effect of Er,Cr:YSGG laser on human dentin fluid flow. *Lasers Med Sci* 2013; 28(6):1445-1451.
20. Perussi LR, Pavone C, de Oliveira GJ, Cerri PS, Marcantonio RA. Effects of the Er,Cr:YSGG laser on bone and soft tissue in a rat model. *Lasers Med Sci* 2012; 27(1):95-102.
21. Sohn DS, Lee JS, An KM, Romanos GE. Erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser-assisted sinus graft procedure. *Lasers Med Sci* 2009; 24(4):673-677.
22. Amirov MV, Grinin VM. Impact of Er, Cr: YSGG-laser on the tooth root cement in the treatment of chronic periodontal disease (the results of electron microscopic studies). *Stomatologiya (Mosk)* 2012; 91(1):20-22.
23. de Freitas PM, Rapozo-Hilo M, Eduardo Cde P, Featherstone JD. In vitro evaluation of erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser-treated enamel demineralization. *Lasers Med Sci* 2010; 25(2):165-170.
24. Kelbauskiene S, Baseviciene N, Goharkhay K, Moritz A, Machiulskiene V. One-year clinical results of Er,Cr:YSGG laser application in addition to scaling

- and root planing in patients with early to moderate periodontitis. *Lasers Med Sci* 2011; 26(4):445-452.
25. Ekworapoj P, Sidhu SK, McCabe JF. Effect of different power parameters of Er,Cr:YSGG laser on human dentine. *Lasers Med Sci* 2007; 22(3):175-182.
26. Eversole LR, RizoIU IM. Preliminary investigations on the utility of an erbium, chromium YSGG laser. *J Calif Dent Assoc* 1995; 23(12):41-47.
27. de Oliveira GJ, Pavone C, Sampaio JE, Marcantonio RA. Influence of the angle of irradiation of the Er,Cr:YSGG laser on the morphology, attachment of blood components, roughness, and root wear: in vitro study. *Lasers Surg Med* 2010; 42(9):683-691.
28. de Oliveira GJ, Sampaio JE, Marcantonio RA. Effects of Er,Cr:YSGG laser irradiation on root surfaces for adhesion of blood components and morphology. *Photomed Laser Surg* 2010; 28(6):751-756.
29. Cesar-Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Moreno H, Jr., Nociti FH, Jr. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J Periodontol* 2003; 74(10):1454-1459.
30. Nociti Junior FH, Cesar Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA, Sallum AW. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J Periodontol* 2002; 73(9):982-987.

31. Rovin S, Costich ER, Gordon HA. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontal Res* 1966; 1(3):193-204.
32. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol* 2008; 79(6):1081-1088.
33. Pavone C, Perussi LR, de Oliveira GJ, Scardueli CR, Cirelli JA, Cerri PS, Junior EM, Spolidorio LC, Marcantonio RA. Effect of Er,Cr:YSGG laser application in the treatment of experimental periodontitis. *Lasers Med Sci* 2014. [Epub ahead of print].
34. Johnson GK, Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol* 2000 2007; 44:178-194.
35. Hakki SS, Berk G, Dundar N, Saglam M, Berk N. Effects of root planing procedures with hand instrument or erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser irradiation on the root surfaces: a comparative scanning electron microscopy study. *Lasers Med Sci* 2010; 25(3):345-353.
36. Tsurumaki Jdo N, Souto BH, Oliveira GJ, Sampaio JE, Marcantonio Junior E, Marcantonio RA. Effect of instrumentation using cures, piezoelectric ultrasonic scaler and Er,Cr:YSGG laser on the morphology and adhesion of blood components on root surfaces: a SEM study. *Braz Dent J* 2011 22(3):185-192.
37. Akiyama F, Aoki A, Miura-Uchiyama M, Sasaki KM, Ichinose S, Umeda M, Ishikawa I, Izumi Y. In vitro studies of the ablation mechanism of

- periodontopathic bacteria and decontamination effect on periodontally diseased root surfaces by erbium:yttrium-aluminum-garnet laser. *Lasers Med Sci* 2011; 26(2):193-204.
38. Yavari HR, Rahimi S, Shahi S, Lotfi M, Barhaghi MH, Fatemi A, Abdolrahimi M. Effect of Er, Cr: YSGG laser irradiation on *Enterococcus faecalis* in infected root canals. *Photomed Laser Surg* 2010; 28 Suppl 1:S91-96.
39. Franzen R, Esteves-Oliveira M, Meister J, Wallerang A, Vanweersch L, Lampert F, Gutknecht N. Decontamination of deep dentin by means of erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser irradiation. *Lasers Med Sci* 2009; 24(1):75-80.
40. Arnabat J, Escribano C, Fenosa A, Vinuesa T, Gay-Escoda C, Berini L, Vinas M. Bactericidal activity of erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser in root canals. *Lasers Med Sci* 2010; 25(6):805-810.
41. Schwarz F, Aoki A, Sculean A, Becker J. The impact of laser application on periodontal and peri-implant wound healing. *Periodontol 2000* 2009; 51:79-108.
42. Lee JH, Heo SJ, Koak JY, Kim SK, Lee SJ, Lee SH. Cellular responses on anodized titanium discs after laser irradiation. *Lasers Surg Med* 2008; 40(10):738-742.
43. Romanos G, Crespi R, Barone A, Covani U. Osteoblast attachment on titanium disks after laser irradiation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006; 21(2):232-236.
44. Matarese G, Isola G, Anastasi GP, Favaloro A, Milardi D, Vermiglio G, Vita G, Cordasco G, Cutroneo G. Immunohistochemical analysis of TGF-beta1 and

- VEGF in gingival and periodontal tissues: a role of these biomarkers in the pathogenesis of scleroderma and periodontal disease. *Int J Mol Med* 2012; 30(3):502-508.
45. Cesar-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH, Jr. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodontal Res* 2006; 41(2):118-123.
46. Correa MG, Gomes Campos ML, Cesar-Neto JB, Casati MZ, Nociti FH, Sallum EA. Histometric evaluation of bone around titanium implants with different surface treatments in rats exposed to cigarette smoke inhalation. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20(6):588-593.

5 Capítulo 2



Laser de Er,Cr:YSGG na criação de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos expostos a inalação de fumaça de cigarro. *

Introdução

O osso é um tipo de tecido conjuntivo altamente especializado que possui como característica importante a constante capacidade de se remodelar ao longo da vida de um indivíduo. Os processos de reabsorção e neoformação ocorrem em todos os ossos e dependem de estímulos celulares, bioquímicos e mecânicos (1). Fatores como o cigarro, podem alterar esses processos fisiológicos e conseqüentemente prejudicar o reparo e a cicatrização de fraturas e defeitos ósseos (2-4). No cigarro são encontradas inúmeras substâncias tóxicas ao organismo e entre os efeitos nocivos que esta droga possui, é possível citar alguns dos mais encontrados clinicamente como cânceres (em seus diversos tipos), doenças pulmonares, cardiovasculares e periodontais (5, 6). Está comprovado também que o cigarro altera as funções de diferenciação celular, de reparo ósseo, a vascularização periférica, a produção de colágeno e o desencadeamento de respostas imunológicas e inflamatórias (7-10). Neste contexto, pesquisadores buscam por novas terapias capazes de melhorar e/ou atenuar os malefícios causados pelo tabagismo e o laser pode ser uma grande alternativa para isso. Os lasers são aparelhos que interagem com diferentes tecidos por meio da emissão de um tipo específico de luz capaz de estimular processos biológicos, químicos e celulares (11). Entre os laser de alta intensidade está o Er,Cr:YSGG (erbio, cromo, ítrio escândio, gálio garnet - WaterlaseTM Biolase, USA) conhecido por sua habilidade em ablasionar diferentes tecidos sem causar danos térmicos ou deletérios, se adequadamente ajustado (12-15).

*Artigo enviado a revista Lasers in Surgery and Medicine

Este laser emite feixe de luz pulsátil com comprimento de onda de 2.780 nm (infravermelho) sendo portanto absorvido pelas moléculas de água e ainda mais por íons OH. Possui frequência de 20Hz, energia de pulso variando entre 0 e 300 mJ e potência ajustável entre 0 e 6W. Quando acionado, a luz emitida é liberada juntamente com um spray de ar e água minimizando os efeitos térmicos produzidos por este aparelho, principalmente quando utilizado em osteotomias (16,17). Trabalhos avaliando os efeitos do laser Er,Cr:YSGG têm mostrado resultados promissores em terapias preventivas, preparos cavitários, procedimentos endodônticos, cirurgias periodontais, descontaminação radicular e osteotomias (18-22). Alguns estudos relataram que este laser pode estimular a atividade osteoblástica e favorecer a formação óssea (16, 23). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do laser de Er,Cr:YSGG após sua utilização na criação de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos submetidos a inalação intermitente de fumaça de cigarro.

Material e métodos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (proc.nº 22/2009) e para realização deste estudo foram utilizados 100 animais (*Rattus Norvegicus*), variação *albinus*, *Holtzman*, adultos, pesando em média 300g, onde foram alimentados com ração sólida e com acesso a água *ad libitum*, antes e durante todo o período experimental.

Inalação da fumaça de cigarro

Apenas 50 animais foram expostos a inalação intermitente da fumaça de cigarro e para isto, uma câmara de vidro nas dimensões de 45x25x20 cm³ foi confeccionada. Em um dos compartimentos dessa câmara, 5 animais por vez foram alojados e expostos

a fumaça gerada por 10 cigarros (1.3mg de nicotina cada) durante 8 minutos. Para manter os cigarros acessos e permitir o fluxo contínuo de fumaça, uma bomba de ar foi acoplada a um dos orifícios presente na câmara. Esse experimento foi realizado 3 vezes ao dia (24), ao longo de cada período experimental avaliado até o momento da eutanásia. Sete dias após o início da exposição a fumaça, os defeitos críticos foram criados.

Procedimentos cirúrgicos

Todos animais foram anestesiados por combinação de Cloridrato de Quetamina (0,08 ml/100g de massa corporal) com Cloridrato de Xilazina (0,04 ml/100g de massa corporal) - Virbac do Brasil Ind. E Com. Ltda.). Após adequada assepsia, foi realizada uma incisão hemi circular cutânea e muscular no sentido ântero-posterior na região da calota craniana. Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos: **Grupo Trefina (GT)** – Foram confeccionados defeitos ósseos críticos circulares na porção mediana da calvária com 8 mm de diâmetro e aproximadamente 1,5 mm de espessura, utilizando uma fresa trefina (Dentoflex, São Paulo, Brasil) montada em contra-ângulo (Anthogyr – Injecta – Diadema, Brasil) com redução de 16:1, acoplado em motor para implante (BML 600 Plus Driller - CK Driller – Brasil) com 1500 rpm, sob irrigação constante com solução salina. **Grupo Laser (GL)** – Os defeitos críticos com 8 mm de diâmetro foram criados com o laser de Er,Cr:YSGG (erbium, chromium: yttrium, scandium, gallium, garnet - Waterlase YSGG, BIOLASE Technology, Irvine, California, USA) nos parâmetros: ponta de safira G4 (diâmetro de 600µm; tamanho de 4mm; fator de transmissão de 100%) posicionada perpendicularmente a região da calvária, potência de 3.0 W, frequência de 20 Hz e irrigação com 10% de ar e 30% de água. **Grupo Trefina Fumante (GTF)** – Os animais foram expostos a fumaça de

cigarro e os defeitos ósseos críticos foram criados com o uso da fresa trefina, da mesma maneira que realizada no grupo trefina (GT). **Grupo Laser Fumante (GLF)** – Os animais inalaram a fumaça de cigarro e os defeitos foram confeccionados por meio da irradiação com o laser de Er,Cr:YSGG (como descrito e feito no grupo laser). Após as cirurgias os animais receberam analgésico (Paracetamol, Medley, Brasil) por gavagem na proporção de 50 ml para cada 100g de peso corporal. Em seguida, os grupos foram aleatoriamente subdivididos em 5 subgrupos (5 animais cada) de acordo com o período experimental, sendo avaliados aos 0, 7, 15, 30 e 60 dias pós operatório.

Processamento dos tecidos

Dentro de cada período de avaliação, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica e a porção superior da calvária foi completamente removida com os tecidos moles e duros. Após fixação em paraformaldeído tamponada a 4% durante 48 horas, as peças foram lavadas e imersas em EDTA 10% (ácido etilenodiamino tetraacético) para início do processo de descalcificação por um período de 8 semanas sendo realizados três trocas semanais. Em seguida foram lavadas e desidratadas em álcool, diafinizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes seriados com 4 µm de espessura foram obtidos e adequadamente preparados para análises histológica e histométrica.

Análise histológica e histométrica

Para avaliação histológica, foi realizada a coloração com hematoxilina e eosina (H&E) e por meio de microscópio óptico Diastar (Leica Reichert & Jung products, Germany) um examinador cego (PSC) para os grupos e períodos selecionou as lâminas correspondentes a parte central do defeito e avaliou o contorno geral do defeito criado,

assim como suas bordas e delimitações, possível neoformação óssea, presença de células gigantes, osteoclastos, osteoblastos e características de processo inflamatório.

A análise histométrica foi feita utilizando as mesmas lâminas histológicas que representavam o centro do defeito crítico. Por meio do programa de análise de imagens Image J (Image J Launcher, 1.37b) foram realizadas medidas do comprimento do defeito, a partir da distância linear entre as bordas dos mesmos. Essas medidas foram realizadas 3 vezes com um intervalo de uma semana entre cada uma delas e a partir dos dados obtidos em milímetros (mm), realizou-se a análise estatística.

Análise estatística

Os dados desse estudo foram numéricos e devido a isso o teste de Normalidade de Shapiro-Wilk foi aplicado. Foi comprovado que os dados estavam de acordo com a normalidade ($p > 0.05$) e dessa forma o teste t-não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos laser e trefina em cada período de tempo, enquanto que o teste Anova complementado pelo teste de Bonferroni foi utilizado para avaliar a evolução temporal do reparo ósseo dentro de cada tratamento. Todos os testes foram aplicados com nível de confiança de 95% ($p < 0.05$).

Resultados

Análise histológica descritiva

As imagens histopatológicas de todos os grupos não apresentaram diferenças quando avaliadas em um mesmo período experimental. **Período inicial (zero)** – Tecido conjuntivo interno (meninge) íntegro com fibras colágenas desorganizadas entremeadas por fibroblastos, presença de infiltrado inflamatório e na superfície do tecido ósseo remanescente foram visualizados osteoblasto, células gigantes (osteoclastos) e

osteócitos aprisionados. Nos grupos irradiados com o laser, as bordas do defeito mostraram a presença de uma linha basófila característica do processo de ablação produzido por este laser. (Figs 1a, 1f, 2A, 2F). Período de **7 dias** – Células características de infiltrado inflamatório crônico, presença de inúmeros vasos sanguíneos e formação de coágulo, tecido conjuntivo denso, periósteo intacto, neoformação óssea visualizada pela presença de tecido ósseo primário com osteócitos e osteoblastos volumosos e tecido osteóide adjacente ao osso neoformado. Início do processo de reparação e nos grupos laser a presença da linha basófila (Figs 1b, 1g, 2B, 2G). Aos **15 dias** – Tecido conjuntivo com vários e densos feixes de fibras colágenas, proliferação de fibroblastos, vasos sanguíneos com menor quantidade de hemácias, persistência de células inflamatórias, gigantes e mesenquimais, tecido ósseo neoformado e osteoclastos mais evidentes. Nos grupos onde o defeito foi criado com o laser, observou-se tecido ósseo em formação sobre a linha basófila (Figs 1c, 1h, 2C, 2H). No período de **30 dias** o tecido conjuntivo denso apresentava fibroblastos mais espessos entre si, tecido ósseo primário em formação e escasso infiltrado inflamatório. Linha basófila ainda persistente nos grupos laser (Figs 1d, 1i, 2D, 2I). Aos **60 dias** conjuntivo formado por densos feixes de fibras colágenas orientadas, entremeadas por inúmeros fibroblastos e inseridas no tecido ósseo (Sharpey), escasso número de células inflamatórias, medula óssea íntegra, formação óssea contínua caracterizada por grande número de osteoblastos volumosos e organizados em fila ao redor do tecido neoformado. Linha basófila praticamente inexistente nos grupos tratados com o laser (Figs 1e, 1j, 2E, 2J).

Grupo Laser

Grupo Trefina

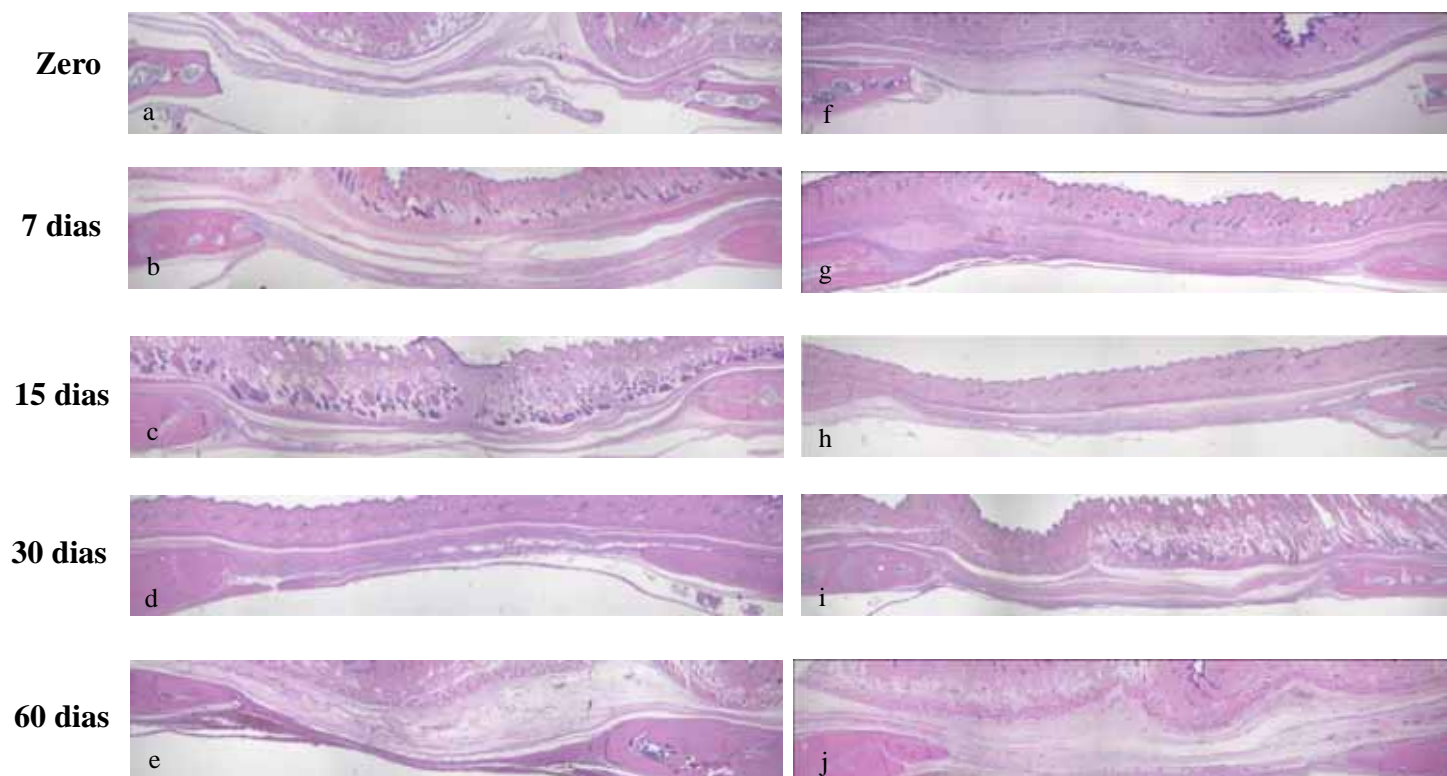


Figura 1 – Fotomicrografias dos defeitos ósseos críticos confeccionados em calota de ratos nos grupos trefina (GT) e laser (GL) em todos os períodos avaliados. Observar os aspectos histológicos dos tecidos conjuntivo e ósseo e a presença da linha basófila nas bordas do defeito dos grupos irradiados com o laser (a, b, c, d, e) (Aumento original 2.5x; H&E).

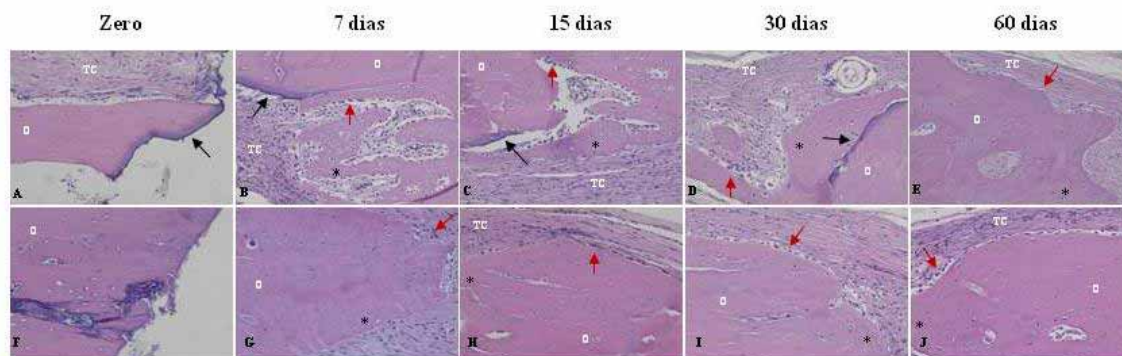


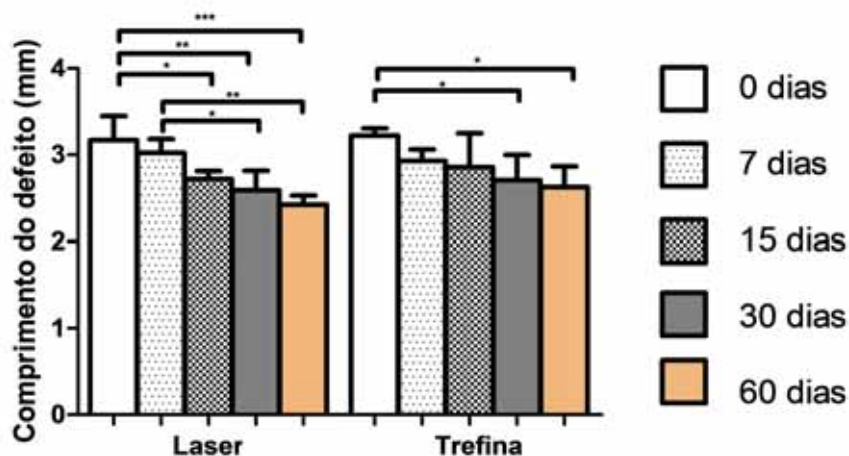
Figura 2 – Fotomicrografias ilustrando tecido ósseo presente nas bordas dos defeitos criados, correspondentes aos grupos laser (A, B, C, D e E) e trefina (F, G, H, I e J). Observar presença de tecido conjuntivo (TC) entremeado por fibroblastos e formando densos feixes de fibras colágenas nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias. No tecido ósseo (O) foram visualizadas osteoblastos (**setas**), osteócitos (em lacunas) e tecido ósseo primário (*) neoformado sobre o osso remanescente. Nos defeitos criados com o laser, houve formação de linha basófila característica da ablação cirúrgica (setas).

Análise histométrica

Grupos não expostos a inalação de fumaça de cigarro

A comparação entre os grupos Trefina e Laser (GT vs GL) não revelou diferenças estatisticamente significantes quanto a distância entre as bordas dos defeitos em nenhum dos períodos avaliados. A análise intragrupos mostrou que no grupo Laser (GL) houve uma redução significativa do defeito crítico nos períodos de 30 e 60 dias em relação aos períodos inicial ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) e 7 dias ($p < 0,05$ e $p < 0,01$). Neste mesmo grupo, o período de 15 dias comparado ao inicial também mostrou melhores resultados quanto a diminuição do defeito ($p < 0,05$). No grupo trefina (GT) o comprimento do defeito foi significativamente menor apenas aos 30 e 60 dias quando comparados ao período inicial ($p < 0,05$). O gráfico 1 expõe as médias e os desvios padrão do comprimento do defeito crítico na região da calota (mm) executado com o laser e a trefina em todos os períodos de avaliação.

Gráfico 1: Média e desvio padrão do comprimento (mm) do defeito crítico de calota executado com o laser de Er,Cr:YSGG e com fresa trefina

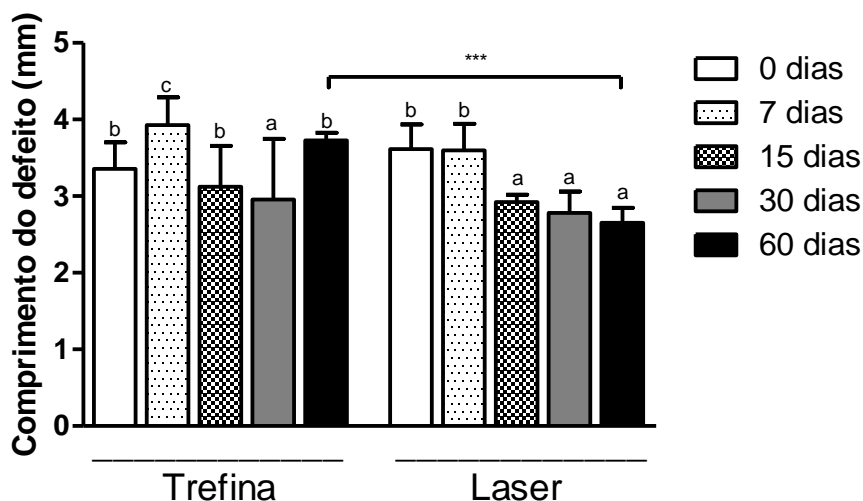


* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ - Teste de Bonferroni

Grupos expostos a inalação de fumaça de cigarro

A comparação entre os dois tipos de instrumentos utilizados para criação dos defeitos críticos mostrou que no grupo laser a distância linear entre as bordas dos defeitos foi estatisticamente menor no período de 60 dias ($p < 0.001$). Os dados da análise intragrupos revelou que no grupo trefina houve uma redução significativa do defeito aos 30 dias comparado com o período de 7 dias ($p < 0.05$) e no grupo laser esta redução ocorreu aos 15 ($p < 0.05$), 30 ($p < 0.05$) e 60 dias ($p < 0.01$) em relação aos períodos inicial (zero) e de 7 dias (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Média e desvio padrão do comprimento (mm) dos defeitos críticos criados em na região de calota com o laser de Er,Cr:YSGG e com a broca trefina.



*** $p < 0.001$ - Defeito com comprimento menor em relação ao grupo trefina (Teste de Bonferroni)

Letras representam diferenças estatísticas intragrupo ($c < b < a$) (Teste t-não pareado)

Discussão

O laser de alta intensidade Erbium, impregnado por Cromo: Ítrio-Scandio-Gálio-Garnet (Er,Cr:YSGG) denominado Waterlase™ (Biolase, USA) apresenta características que possibilitam o seu uso em diversas áreas da Odontologia. Em 2001, foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) para incisões, excisões, vaporização e coagulação em tecidos moles orais e um ano depois, foi liberado para procedimentos nos tecidos ósseos incluindo ressecções, osteotomias e plastias (25-28). Baseado nos relatos da literatura este laser apresenta maiores vantagens que outros lasers cirúrgicos, causando mínimo dano térmico aos tecidos irradiados (25, 28). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do laser de Er,Cr:YSGG na criação

de defeitos críticos em calvaria de animais submetidos a inalação intermitente de fumaça de cigarro. O modelo experimental de defeito crítico escolhido neste trabalho apresenta como principais vantagens a facilidade de execução, o baixo custo, a padronização metodológica e a possibilidade de analisar os estágios de reparo e nova formação óssea. Além disso, a área de calota apresenta propriedades anatômicas e fisiológicas semelhantes com a região maxilofacial humana, viabilizando a aplicação clínica dos resultados encontrados *in vivo* (29-31). No presente estudo, as características histopatológicas observadas nos grupos laser e trefina revelaram que ao longo dos períodos avaliados houve uma tentativa de reparo tecidual na região onde o defeito foi criado com organização de tecido conjuntivo denso, proliferação celular, formação de coágulo e neoformação de tecido ósseo primário. Além destes achados histológicos, nos grupos de animais onde a osteotomia foi feita com o laser, foi observada a presença de uma linha basófila nas bordas dos defeitos, evidente principalmente nos períodos inicial (zero), 7 e 15 dias. Esta camada foi igualmente observada e descrita em outros trabalhos *in vitro* como sendo o resultado de mudanças térmicas causadas pela ablação tissular promovida pelos lasers de Er:YAG e Er,Cr:YSGG. Em 2009, Yoshino et al. (32) relataram que mesmo com a presença desta camada basófila foi possível observar a formação de tecido ósseo primário sobre o osso remanescente, indicando que o aquecimento produzido pelo laser de Er,Cr:YSGG foi irrelevante e não prejudicou o processo de reparo da região. Estes resultados corroboram com os descritos por Perussi et al. (2012) ⁽²²⁾ em um estudo *in vivo* comparando o reparo ósseo de defeitos não críticos criados no crânio de ratos com o uso de fresa ou irradiação do laser de Er,Cr:YSGG nos mesmos parâmetros utilizados em nosso estudo. Segundo os autores, a camada basófila produzida pelo laser não atrapalhou a formação óssea dos defeitos que

foi significativamente maior com o uso do laser em relação a fresa trefina, concluindo que este laser pode ser uma ferramenta promissora em cirurgias ósseas.

Alguns trabalhos que utilizaram os lasers de alta intensidade em osteotomias, apresentaram como desvantagens carbonização, derretimento e necrose da área irradiada, além de atraso nos estágios iniciais de reparo (33-36). É possível que esses efeitos deletérios sejam uma consequência do inadequado ajuste dos parâmetros do aparelho e do modo de interação desses lasers com os tecidos. Baseado nos achados histológicos do nosso estudo, nenhuma dessas características foi observada, indicando que os padrões aplicados e o tipo de aparelho selecionado foram corretos. Esse desempenho satisfatório do laser de Er,Cr:YSGG em tecidos duros pode estar relacionado com o seu mecanismo de ação, conhecido como fotoablação (14, 15). Neste processo, a energia emitida é seletivamente absorvida pelas moléculas de água e íons OH presentes nos tecidos provocando o aquecimento até a temperatura de vaporização. Essa água vaporizada se expande aumentando a pressão interna tecidual, gerando micro explosões e eliminação dos substratos em forma de micropartículas. Além disso, a energia emitida por este laser está associada a um sistema hidrocínético, diminuindo ainda mais os danos térmicos aos tecidos subjacentes.

Os efeitos nocivos que o cigarro causa na vascularização, cicatrização e reparação dos diferentes tecidos está amplamente comprovado na literatura (37-40). Em relação ao tecido ósseo, estudos mostraram que tanto a nicotina como os outros componentes tóxicos presentes no cigarro podem diminuir o reparo de fraturas ósseas, reduzir a densidade mineral e o volume de osso neoformado, acelerar os níveis de perda óssea horizontal e vertical no periodonto, inibir a proliferação dos osteoblastos e estimular a diferenciação osteoclástica, além de alterar a vascularização, promovendo

um efeito vasoconstritor (41, 42, 43). Os dados histométricos relatados no grupo trefina, mostraram essa influência negativa do cigarro na formação óssea, considerando que aos 60 dias a contínua tendência ao reparo tecidual não ocorreu. Estes resultados podem estar relacionados ao efeito negativo dose-dependente, considerando que quanto maior e mais prolongada a exposição ao cigarro, mais nocivo o seu efeito. Por outro lado, as avaliações realizadas nos grupos laser revelaram que o reparo ósseo ocorreu de maneira gradativa e constante, mostrando diminuição significativa no comprimento do defeito aos 15 ($p < 0.05$), 30 ($p < 0.05$) e 60 dias ($p < 0.01$) em relação aos períodos mais iniciais. Esses dados indicam que mesmo diante da influência negativa do cigarro, este laser foi capaz de estimular o reparo ósseo da região ao longo do tempo, revelando maiores benefícios que a fresa trefina. Acredita-se que isto tenha acontecido devido a interação da energia emitida pelo laser com as células e moléculas presentes no tecido ósseo, resultando no estímulo das atividades osteoblásticas e consequentemente maior formação óssea da região. Esse mesmo efeito benéfico dos lasers de Érbio no tecido ósseo foi previamente relatado em outros trabalhos (22, 44, 45, 46). Os autores revelaram que de acordo com os parâmetros ajustados, os lasers de Er:YAG e Er,Cr:YSGG podem ser seguramente utilizados em osteotomias, promovendo cortes precisos, hemostasia e mínimo dano térmico tecidual, além de estimularem a neoformação óssea da região irradiada. Associado a estes dados, o estudo *in vitro* de Lee JH e al. em 2008 (47) mostrou que o laser de Er,Cr:YSGG pode ainda induzir a proliferação e diferenciação osteoblástica. Entretanto, mesmo diante desses resultados promissores, o mecanismo de ação dos lasers de alta intensidade nos tecidos ósseos ainda não foi completamente esclarecido, uma vez que a maioria dos estudos disponíveis na literatura avaliam a influência dos lasers de baixa intensidade no metabolismo celular, bioquímico e molecular dos tecidos duros.

Conclusão

Dentro das limitações deste trabalho, foi possível concluir que a utilização do laser de Er,Cr:YSGG foi permitiu a criação dos defeitos críticos, ablasionando o tecido ósseo na região de calota, sem causar necrose ou quaisquer outros danos térmicos aos tecidos subjacentes, além de estimular o processo de reparo tecidual independente da presença de cigarro.

Referências

1. Kido HW, Bossini PS, Tim CR, Parizotto NA, da Cunha AF, Malavazi I, Renno AC. Evaluation of the bone healing process in an experimental tibial bone defect model in ovariectomized rats. *Aging Clin Exp Res*. 2014 Feb 15. [Epub ahead of print]
2. Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. *J Clin Periodontol*. 2005; 32 (6): 180-195.
3. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, De Laet C, Eisman JA, Fujiwara S, Kroger H, McCloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ, Pols H, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2005; 16(2): 155-162.
4. Nociti Júnior FH, Nogueira Filho GR, Tramontina VA, Machado MA, Barros SP, Sallum EA, Sallum AW. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on periodontal breakdown: an in vivo study. *J Periodontal Res*. 2001; 36(6): 361-6.
5. WHO urges more countries to require large, graphic health warnings on tobacco packaging: the WHO report on the global tobacco epidemic, 2011 examines anti-tobacco mass-media campaigns. *Cent Eur J Public Health*. 2011; 19(3): 133, 151.
6. Armitage AK, Turner DM. Absorption of nicotine in cigarette and cigar smoke through the oral mucosa. *Nature*. 1970; 226(5252): 1231-32.

7. Gullihorn L, Karpman R, Lippiello L. Differential effects of nicotine and smoke condensate on bone cell metabolic activity. *J Orthop Trauma*. 2005; 19(1): 17-22.
8. Gamal AY, Bayomy MM. Effect of cigarette smoking on human PDL fibroblasts attachment to periodontally involved root surfaces in vitro. *J Clin Periodontol*. 2002; 29(8): 763-70.
9. Hapidin H, Othman F, Soelaiman IN, Shuid AN, Luke DA, Mohamed N. Negative effects of nicotine on bone-resorbing cytokines and bone histomorphometric parameters in male rats. *J Bone Miner Metab*. 2007; 25(2): 93-8.
10. Liu X, Kohyama T, Kobayashi T, Abe S, Kim HJ, Reed EC, Rennard SI. Cigarette smoke extract inhibits chemotaxis and collagen gel contraction mediated by human bone marrow osteoprogenitor cells and osteoblast-like cells. *Osteoporos Int*. 2003; 14(3): 235-242.
11. Sohn DS, Lee JS, An KM, Romanos GE. Erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser-assisted sinus graft procedure. *Lasers Med Sci*. 2009; 24(4): 673-7.
12. Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA, Mizutani K, Sasaki KM, Izumi Y. Application of lasers in periodontics: true innovation or myth? *Periodontol* 2000. 2009; 50: 90-126.
13. Clarkson DM. A review of technology and safety aspects of erbium lasers in dentistry. *Dent Update* 2001; 28(6):298-302.

14. Kimura Y, Yu DG, Fujita A, Yamashita A, Murakami Y, Matsumoto K. Effects of erbium,chromium:YSGG laser irradiation on canine mandibular bone. *J Periodontol.* 2001; 72(9): 1178-82.
15. van As G. Erbium lasers in dentistry. *Dent Clin North Am.* 2004; 48(4): 1017-1059.
16. Wang X, Ishizaki NT, Suzuki N, Kimura Y, Matsumoto K. Morphological changes of bovine mandibular bone irradiated by Er,Cr:YSGG laser: an in vitro study. *J Clin Laser Med Surg.* 2002; 20(5): 245-250.
17. Kelbauskiene S, Baseviciene N, Goharkhay K, Moritz A, Machiulskiene V. One-year clinical results of Er,Cr:YSGG laser application in addition to scaling and root planing in patients with early to moderate periodontitis. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(4): 445-452.
18. Sohn DS, Lee JS, An KM, Romanos GE. Erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser-assisted sinus graft procedure. *Lasers Med Sci.* 2009; 24(4): 673-7.
19. Yilmaz HG, Bayindir H. Clinical and scanning electron microscopy evaluation of the Er,Cr:YSGG laser therapy for treating dentine hypersensitivity: short-term, randomised, controlled study. *J Oral Rehabil.* 2014; 41(5): 392-8.
20. Yavari HR, Rahimi S, Shahi S, Lotfi M, Barhaghi MH, Fatemi A, Abdolrahimi M. Effect of Er, Cr: YSGG laser irradiation on *Enterococcus faecalis* in infected root canals. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28 Suppl (1): S91-96.

21. Geraldo-Martins VR, Lepri CP, Palma-Dibb RG. Influence of Er,Cr:YSGG laser irradiation on enamel caries prevention. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(1): 33-39.
22. Perussi LR, Pavone C, de Oliveira GJ, Cerri PS, Marcantonio RA. Effects of the Er,Cr:YSGG laser on bone and soft tissue in a rat model. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(1): 95-102.
23. Romanos G, Crespi R, Barone A, Covani U. Osteoblast attachment on titanium disks after laser irradiation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006; 21(2): 232-236.
24. Nociti Junior FH, Cesar Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA, Sallum AW. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J Periodontol.* 2002; 73(9): 982-987.
25. Cesar-Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Moreno H, Jr., Nociti FH, Jr. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J Periodontol.* 2003; 74 (10): 1454-9.
26. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Yang LC, Chou MY. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. *J Periodontal Res.* 2002; 37(4): 279-85.
27. Clarke NG, Shephard BC, Hirsch RS. The effects of intra-arterial epinephrine and nicotine on gingival circulation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1981; 52(6): 577-82.

28. Clarkson DM. A review of technology and safety aspects of erbium lasers in dentistry. *Dent Update*. 2001; 28(6): 298-302.
29. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*. 1990; 1(1): 60-68.
30. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986(205): 299-308.
31. Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan BD. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat (Basel)*. 1990; 138(3): 185-192.
32. Yoshino T, Aoki A, Oda S, Takasaki AA, Mizutani K, Sasaki KM, Kinoshita A, Watanabe H, Ishikawa I, Izumi Y. Long-term histologic analysis of bone tissue alteration and healing following Er:YAG laser irradiation compared to electrosurgery. *J Periodontol*. 2009; 80(1): 82-92.
33. Romanos G, Chong Huat S, Ng K, Chooi Gait T. A preliminary study of healing of superpulsed carbon dioxide laser incisions in the hard palate of monkeys. *Lasers Surg Med*. 1999; 24(5):368-374.
34. Romanos G, Nentwig GH. Diode laser (980 nm) in oral and maxillofacial surgical procedures: clinical observations based on clinical applications. *J Clin Laser Med Surg*. 1999; 17(5):193-197.
35. Sasaki KM, Aoki A, Ichinose S, Yoshino T, Yamada S, Ishikawa I. Scanning electron microscopy and Fourier transformed infrared spectroscopy analysis of bone removal using Er:YAG and CO₂ lasers. *J Periodontol*. 2002; 73(6):643-652.

36. Ivanenko MM, Fahimi-Weber S, Mitra T, Wierich W, Hering P. Bone tissue ablation with sub-microS pulses of a Q-switch CO(2) laser: histological examination of thermal side effects. *Lasers Med Sci.* 2002; 17(4):258-264.
37. Feldman RS, Bravacos JS, Rose CL. Association between smoking different tobacco products and periodontal disease indexes. *J Periodontol.* 1983; 54(8):481-487.
38. Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol.* 2004; 75(2):196-209.
39. Raulin LA, McPherson JC, 3rd, McQuade MJ, Hanson BS. The effect of nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surfaces in vitro. *J Periodontol.* 1988; 59(5):318-325.
40. Kerdvongbundit V, Wikesjo UM. Effect of smoking on periodontal health in molar teeth. *J Periodontol.* 2000; 71(3):433-437.
41. Axelsson P, Paulander J, Lindhe J. Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75-year-old individuals. *J Clin Periodontol* 1998; 25(4):297-305.
42. Benatti BB, Cesar-Neto JB, Goncalves PF, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Smoking affects the self-healing capacity of periodontal tissues. A histological study in the rat. *Eur J Oral Sci* 2005; 113(5):400-403.
43. Bergstrom J, Bostrom L. Tobacco smoking and periodontal hemorrhagic responsiveness. *J Clin Periodontol* 2001; 28(7):680-685.

44. Mizutani K, Aoki A, Takasaki AA, Kinoshita A, Hayashi C, Oda S, Ishikawa I. Periodontal tissue healing following flap surgery using an Er:YAG laser in dogs. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(4): 314-324.
45. Schwarz F, Aoki A, Becker J, Sculean A. Laser application in non-surgical periodontal therapy: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(8 Suppl): 29-44.
46. Wang X, Zhang C, Matsumoto K. In vivo study of the healing processes that occur in the jaws of rabbits following perforation by an Er,Cr:YSGG laser. *Lasers Med Sci* 2005; 20(1):21-27.
47. Lee JH, Heo SJ, Koak JY, Kim SK, Lee SJ, Lee SH. Cellular responses on anodized titanium discs after laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2008; 40(10): 738-742.

*6 Considerações
Finais*



6 Considerações finais

Desde a primeira aplicação do laser de rubi em odontologia realizada por Goldman em 1965, a aplicabilidade clínica dos diferentes lasers de alta e baixa intensidade têm sido amplamente pesquisada nos campos terapêutico, estético e preventivo. Em sua maioria, os estudos que avaliam a influência dos lasers nos tipos de tecidos e superfícies, relatam resultados promissores, considerando sempre as muitas variáveis que interferem no sucesso do uso destes aparelhos, incluindo: o comprimento de onda emitido (determinante para interação dos lasers com as células e tecidos), potência, frequência, distância do foco, tipo de pulso, tempo e ângulo de irradiação, entre outros^{3, 5, 26, 33, 57, 86, 92, 95, 98, 103}.

Para realização deste projeto, a escolha do laser de Er,Cr:YSGG foi feita levando em consideração: 1) As propriedades e o mecanismo de ação tecidual que ele possui; 2) A necessidade de melhorar os resultados clínicos obtidos no tratamento de pacientes periodontais fumantes e 3) A busca de novas ferramentas capazes de estimular a formação óssea e a regeneração periodontal. Estudos em animais anteriormente realizados pelo nosso grupo de pesquisadores constataram que o laser de Er,Cr:YSGG proporciona condições favoráveis ao reparo tecidual na região de furca e estimula a formação óssea de defeitos criados em calvária. Além disso quando este mesmo laser foi irradiado em superfícies radiculares houve adequada adesão de componentes sanguíneos compatível com o grupo submetido apenas a raspagem e alisamento radicular manual^{33, 73, 74, 94}. Dessa forma, o presente trabalho buscou avaliar a influência deste laser na criação de defeitos ósseos críticos e no tratamento de doença periodontal induzida quando na presença de cigarro, um importante fator de risco para a periodontite e o reparo ósseo. Os resultados histomorfométricos, imuno-inflamatórios e

das reações de PCR em tempo real obtidos no primeiro estudo, mostraram que após o tratamento com o laser houve diminuição do infiltrado inflamatório, organização do tecido conjuntivo com presença de fibras colágenas bem orientadas, fibroblastos e formação óssea na região de furca, visualizada pelas inúmeras linhas de reversão. Em concordância com os achados histológicos, a marcação positiva de osteoblastos, fibroblastos e osteoclastos pelos anticorpos TRAP e RANKL e a expressão de VEGF e FGF em todos os grupos analisados, comprovam intensa atividade de reparo e remodelação óssea na região e indicam que os efeitos produzidos por este laser nos tecidos periodontais podem ser comparáveis aos da raspagem e alisamento radicular. Resultados semelhantes já foram descritos na literatura por Schwarz et al.⁸¹ (2008) em uma revisão sistemática sobre os efeitos dos lasers na terapia periodontal não cirúrgica. Outro aspecto importante a ser considerado e que pode explicar os benefícios dos lasers de Érbio na terapia periodontal é o efeito bactericida produzido por eles. Os estudos realizados por Yavari et al.¹⁰² (2010), Arnabat et al.⁷ (2010) e Akiyama et al.⁴ (2011), mostraram que os lasers de Er:YAG e Er,Cr:YSGG eliminaram colônias de *Porphyromonas gingivalis* e descontaminaram superfícies radiculares colonizadas por *Enterococcus faecalis*. Quando irradiado nos tecidos duros, os lasers podem apresentar algumas desvantagens como derretimento, carbonização e necrose. Um dos objetivos do presente estudo foi avaliar os efeitos do laser de Er,Cr:YSGG na criação de defeitos ósseos críticos. Durante as cirurgias o laser proporcionou cortes precisos, maior hemostasia e constante irrigação. Os aspectos histomorfológicos foram semelhantes entre os grupos laser e trefina para todos os períodos avaliados, mostrando organização do tecido conjuntivo, diminuição das células inflamatórias e presença de tecido ósseo neoformado ao longo do tempo. Nas imagens correspondentes aos grupos lasers, foi visualizada uma linha basófila nas bordas dos defeitos criados, característica do

processo de ablação pelo qual este laser interage com os tecidos^{30, 42, 82}. Como nenhuma diferença histométrica foi detectada entre os grupos laser e trefina e os aspectos histológicos foram semelhantes entre as estas duas ferramentas, é possível afirmar que o laser não causou nenhum tipo de dano térmico aos tecidos e não prejudicou o reparo ósseo na região.

Está mais do que comprovado na literatura que o cigarro é um fator de risco para muitas doenças, inclusive as periodontais. Tabagistas apresentam maiores chances de desenvolver periodontites, piores índices clínicos da doença e reparo tecidual deficiente em relação aos pacientes não fumantes^{9, 11, 29, 58, 59, 75}. O cigarro pode modificar as funções de diferenciação celular, a vascularização periférica, o desencadeamento das respostas imune-inflamatórias e o reparo do tecido ósseo^{45, 51, 55}.

Estudos em animais que utilizaram o mesmo método de indução ao fumo aplicado em nosso estudo, relataram que o cigarro influenciou negativamente os aspectos histológicos e histométricos avaliados e comprometeu o reparo tecidual da região^{21, 70}. Neste trabalho, os resultados do primeiro estudo mostraram que nos grupos de animais expostos a fumaça de cigarro os valores na porcentagem de tecido ósseo presente na região de furca foram menores em comparação aos não fumantes, no entanto essas diferenças não foram significantes. No estudo 2, a influência negativa do cigarro no processo de reparo ósseo foi comprovada pelos resultados obtidos no grupo trefina, uma vez que a diminuição da distância entre as bordas do defeito não ocorreu de forma gradativa ao longo do tempo, atingindo aos 60 dias valores equivalentes aos períodos iniciais (zero e 7 dias). Por outro lado, no grupo onde a criação dos defeitos foi realizada com o laser, o padrão de reparo ósseo se manteve crescente e constante, inclusive nos períodos mais longos, mostrando que o laser de Er,Cr:YSGG estimulou a

formação óssea independente da exposição a fumaça de cigarro. Com base nesses resultados, foi possível comprovar que maiores benefícios ao reparo ósseo na região de calota foram obtidos com a irradiação do laser em comparação a fresa trefina, método convencionalmente utilizado em osteotomias.

A luz laser possui propriedades únicas que possibilitam sua aplicação nas mais diversas áreas da saúde. Em odontologia, a literatura científica disponível sobre os efeitos dos lasers nos diferentes tecidos relata resultados bastante satisfatórios, no entanto, diante da diversidade de aparelhos disponíveis no mercado e das inúmeras variáveis envolvidas com o uso dos laser, mais estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos precisam ser realizados para comprovar os verdadeiros benefícios que eles podem proporcionar na prática clínica.

7 Conclusão



7 Conclusão

De acordo com as limitações deste estudo foi possível concluir que:

- A utilização do laser de Er,Cr:YSGG, associado ou não a raspagem radicular, promoveu condições favoráveis ao reparo tecidual inclusive nos animais expostos a fumaça de cigarro, apresentando resultados semelhantes aos obtidos com a raspagem e o alisamento radicular.

- A criação de defeitos críticos na região de calvária com este laser, resultou em ablação precisa, eficiente e segura do tecido ósseo, sem provocar danos ou sinais de necrose. O laser de Er,Cr:YSGG foi ainda capaz de estimular o reparo tecidual e a formação óssea dos defeitos criados, independente da exposição a fumaça de cigarro.

Referências



Referências*

1. Abood LG, Banerjee S, Kanne DB. Sites, mechanisms, and structural characteristics of the brain's nicotine receptor. *J Subst Abuse*. 1989; 1(3): 259-71.
2. Absten GT. Physics of light and lasers. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1991; 18(3): 407-27.
3. Akiyama F, Aoki A, Miura-Uchiyama M, Sasaki KM, Ichinose S, Umeda M, et al. In vitro studies of the ablation mechanism of periodontopathic bacteria and decontamination effect on periodontally diseased root surfaces by erbium:yttrium-aluminum-garnet laser. *Lasers Med Sci*. 2011; 26(2): 193-204.
4. Aoki A, Mizutani K, Takasaki AA, Sasaki KM, Nagai S, Schwarz F, et al. Current status of clinical laser applications in periodontal therapy. *Gen Dent*. 2008; 56(7): 674-87.
5. Armitage AK, Turner DM. Absorption of nicotine in cigarette and cigar smoke through the oral mucosa. *Nature*. 1970; 226 (5252): 1231-2.
6. Arnabat J, Escribano C, Fenosa A, Vinuesa T, Gay-Escoda C, Berini L, et al. Bactericidal activity of erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser in root canals. *Lasers Med Sci*. 2010; 25(6): 805-10.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver.

Disponível no site <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

7. Arnabat-Dominguez J, Bragado-Novel M, Espana-Tost AJ, Berini-Aytes L, Gay-Escoda C. Advantages and esthetic results of erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser application in second-stage implant surgery in patients with insufficient gingival attachment: a report of three cases. *Lasers Med Sci.* 2010; 25(3): 459-64.
8. Axelsson P, Paulander J, Lindhe J. Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75-year-old individuals. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(4): 297-305.
9. Azzeh MM. Er,Cr:YSGG laser-assisted surgical treatment of peri-implantitis with 1-year reentry and 18-month follow-up. *J Periodontol.* 2008; 79(10): 2000-5.
10. Bastiaan RJ. The effects of tobacco smoking on periodontal tissues. *J West Soc Periodontol Periodontal Abstr.* 1979; 27(4): 120-5.
11. Benatti BB, Cesar-Neto JB, Goncalves PF, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Smoking affects the self-healing capacity of periodontal tissues. A histological study in the rat. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113(5): 400-3.
12. Bergstrom J. Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1989; 17(5): 245-7.
13. Bergstrom J, Bostrom L. Tobacco smoking and periodontal hemorrhagic responsiveness. *J Clin Periodontol.* 2001; 28(7): 680-5.
14. Bergstrom J. Periodontitis and smoking: an evidence-based appraisal. *J Evid Based Dent Pract.* 2006; 6(1): 33-41.

15. Bostrom L, Linder LE, Bergstrom J. Clinical expression of TNF-alpha in smoking-associated periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(10): 767-73.
16. Bostrom L, Linder LE, Bergstrom J. Smoking and cervicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1999; 26(6): 352-7.
17. Bostrom L, Linder LE, Bergstrom J. Smoking and GCF levels of IL-1beta and IL-1ra in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2000; 27(4): 250-5.
18. Caldeira EJ, Carvalho CA, Padovani CR, Camilli JA, Garcia PJ, Cagnon VH. Morphological alterations in the epithelium of the oral mucosa of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to long-term systemic nicotine treatment. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(1): 83-9.
19. Calsina G, Ramon JM, Echeverria JJ. Effects of smoking on periodontal tissues. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(8): 771-6.
20. Cesar Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodontal Res.* 2006; 41(2): 118-23.
21. Cesar Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Moreno H Jr., Nociti FH. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J Periodontol.* 2003; 74(10): 1454-9.

22. Cesar Neto JB, Benatti BB, Manzi FR, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH. The influence of cigarette smoke inhalation on bone density. A radiographic study in rats. *Braz Oral Res.* 2005; 19(1): 47-51.
23. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Yang LC, Chou MY. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. *J Periodontal Res.* 2002; 37(4): 279-85.
24. Clarke NG, Shephard BC, Hirsch RS. The effects of intra-arterial epinephrine and nicotine on gingival circulation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1981; 52(6): 577-82.
25. Clarkson DM. A review of technology and safety aspects of erbium lasers in dentistry. *Dent Update.* 2001; 28(6): 298-302.
26. Corraini P, Baelum V, Pannuti CM, Pustiglioni AN, Romito GA, Pustiglioni FE. Periodontal attachment loss in an untreated isolated population of Brazil. *J Periodontol.* 2008; 79(4): 610-20.
27. Corraini P, Baelum V, Pannuti CM, Pustiglioni AN, Romito GA, Pustiglioni FE. Risk indicators for increased probing depth in an isolated population in Brazil. *J Periodontol.* 2008; 79(9): 1726-34.
28. Correa MG, Campos ML, Benatti BB, Marques MR, Casati MZ, Nociti FH Jr., et al. The impact of cigarette smoke inhalation on the outcome of enamel matrix derivative treatment in rats: histometric analysis. *J Periodontol.* 2010; 81(12): 1820-8.

29. Crespi R, Barone A, Covani U. Er:YAG laser scaling of diseased root surfaces: a histologic study. *J Periodontol.* 2006; 77(2): 218-22.
30. Danielson K, Putt F, Truman P, Kivell BM. The effects of nicotine and tobacco particulate matter on dopamine uptake in the rat brain. *Synapse.* 2014; 68(2): 45-60.
31. de Heens GL, van der Velden U, Loos BG. Cigarette smoking enhances T cell activation and a Th2 immune response; an aspect of the pathophysiology in periodontal disease. *Cytokine.* 2009; 47(3): 157-61.
32. de Oliveira GJ, Pavone C, Sampaio JE, Marcantonio RA. Influence of the angle of irradiation of the Er,Cr:YSGG laser on the morphology, attachment of blood components, roughness, and root wear: in vitro study. *Lasers Surg Med.* 2010; 42(9): 683-91.
33. de Oliveira GJ, Sampaio JE, Marcantonio RA. Effects of Er,Cr:YSGG laser irradiation on root surfaces for adhesion of blood components and morphology. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(6): 751-6.
34. Derdilopoulou FV, Nonhoff J, Neumann K, Kielbassa AM. Microbiological findings after periodontal therapy using cures, Er:YAG laser, sonic, and ultrasonic scalers. *J Clin Periodontol.* 2007; 34(7): 588-98.
35. Dietrich T, Bernimoulin JP, Glynn RJ. The effect of cigarette smoking on gingival bleeding. *J Periodontol.* 2004; 75(1): 16-22.

36. Eberhard J, Ehlers H, Falk W, Acil Y, Albers HK, Jepsen S. Efficacy of subgingival calculus removal with Er:YAG laser compared to mechanical debridement: an in situ study. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(6): 511-8.
37. Etter JF, Vu Duc T, Perneger TV. Saliva cotinine levels in smokers and nonsmokers. *Am J Epidemiol.* 2000; 151(3): 251-8.
38. Etzel RA. A review of the use of saliva cotinine as a marker of tobacco smoke exposure. *Prev Med.* 1990; 19(2): 190-7.
39. Feldman RS, Bravacos JS, Rose CL. Association between smoking different tobacco products and periodontal disease indexes. *J Periodontol.* 1983; 54(8): 481-7.
40. Figueiredo A, Soares S, Lopes H, dos Santos JN, Ramalho LM, Cangussu MC, et al. Destructive periodontal disease in adult Indians from Northeast Brazil: cross-sectional study of prevalence and risk indicators. *J Clin Periodontol.* 2013; 40(11): 1001-6.
41. Folwaczny M, Benner KU, Flasskamp B, Mehl A, Hickel R. Effects of 2.94 microm Er:YAG laser radiation on root surfaces treated in situ: a histological study. *J Periodontol.* 2003; 74(3): 360-5.
42. Fu M, Fernandez E, Pascual JA, Martinez-Sanchez JM, Agudo A, Moncada A, et al. Stages of change, smoking characteristics, and cotinine concentrations in smokers: setting priorities for smoking cessation. *Prev Med.* 2011; 52(2): 139-45.
43. Fuller TA. The physics of surgical lasers. *Lasers Surg Med.* 1980; 1(1): 5-14.

44. Gamal AY, Bayomy MM. Effect of cigarette smoking on human PDL fibroblasts attachment to periodontally involved root surfaces in vitro. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(8): 763-70.
45. Gelskey SC. Cigarette smoking and periodontitis: methodology to assess the strength of evidence in support of a causal association. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999; 27(1): 16-24.
46. Giannopoulou C, Cappuyns I, Mombelli A. Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(11): 996-1002.
47. Graswinckel JE, van der Velden U, van Winkelhoff AJ, Hoek FJ, Loos BG. Plasma antibody levels in periodontitis patients and controls. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(7): 562-8.
48. Gregory RO. Laser physics and physiology. *Clin Plast Surg.* 1998; 25(1): 89-93.
49. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, et al. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol.* 1995; 66(1): 23-9.
50. Gullihorn L, Karpman R, Lippiello L. Differential effects of nicotine and smoke condensate on bone cell metabolic activity. *J Orthop Trauma.* 2005; 19(1): 17-22.
51. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 2001; 28(5): 377-88.

52. Hakki SS, Berk G, Dundar N, Saglam M, Berk N. Effects of root planing procedures with hand instrument or erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser irradiation on the root surfaces: a comparative scanning electron microscopy study. *Lasers Med Sci.* 2010; 25(3): 345-53.
53. Hakki SS, Korkusuz P, Berk G, Dundar N, Saglam M, Bozkurt B, et al. Comparison of Er,Cr:YSGG laser and hand instrumentation on the attachment of periodontal ligament fibroblasts to periodontally diseased root surfaces: an in vitro study. *J Periodontol.* 2010; 81(8): 1216-25.
54. Hapidin H, Othman F, Soelaiman IN, Shuid AN, Luke DA, Mohamed N. Negative effects of nicotine on bone-resorbing cytokines and bone histomorphometric parameters in male rats. *J Bone Miner Metab.* 2007; 25(2): 93-8.
55. Horn AS, Cuello AC, Miller RJ. Dopamine in the mesolimbic system of the rat brain: endogenous levels and the effects of drugs on the uptake mechanism and stimulation of adenylate cyclase activity. *J Neurochem.* 1974; 22(2): 265-70.
56. Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA, Mizutani K, Sasaki KM, Izumi Y. Application of lasers in periodontics: true innovation or myth? *Periodontol 2000.* 2009; 50: 90-126.
57. Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol.* 2004; 75(2): 196-209.
58. Johnson GK, Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol 2000.* 2007; 44: 178-94.

59. Kallala R, Barrow J, Graham SM, Kanakaris N, Giannoudis PV. The in vitro and in vivo effects of nicotine on bone, bone cells and fracture repair. *Expert Opin Drug Saf.* 2013; 12(2): 209-33.
60. Kamma JJ, Nakou M, Baehni PC. Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. *J Periodontal Res.* 1999; 34(1): 25-33.
61. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, De Laet C, Eisman JA, et al. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2005; 16(2): 155-62.
62. Kelbauskiene S, Baseviciene N, Goharkhay K, Moritz A, Machiulskiene V. One-year clinical results of Er,Cr:YSGG laser application in addition to scaling and root planing in patients with early to moderate periodontitis. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(4): 445-52.
63. Kerdvongbundit V, Wikesjo UM. Effect of smoking on periodontal health in molar teeth. *J Periodontol.* 2000; 71(3): 433-7.
64. Kimura Y, Yu DG, Fujita A, Yamashita A, Murakami Y, Matsumoto K. Effects of erbium,chromium:YSGG laser irradiation on canine mandibular bone. *J Periodontol.* 2001; 72(9): 1178-82.
65. Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res.* 2012; 91(2): 142-9.
66. Lee JH, Heo SJ, Koak JY, Kim SK, Lee SJ, Lee SH. Cellular responses on anodized titanium discs after laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2008; 40(10): 738-42.

67. Li S, Kim KY, Kim JH, Park MS, Bahk JY, Kim MO. Chronic nicotine and smoking treatment increases dopamine transporter mRNA expression in the rat midbrain. *Neurosci Lett*. 2004; 363(1): 29-32.
68. Nociti Junior FH, Nogueira Filho GR, Tramontina VA, Machado MA, Barros SP, Sallum EA, et al. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on periodontal breakdown: an in vivo study. *J Periodontal Res*. 2001; 36(6): 361-6.
69. Nociti Junior FH, Cesar Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA, Sallum AW. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J Periodontol*. 2002; 73(9): 982-7.
70. Olayanju AO, Rahamon SK, Arinola OG. Salivary immunoglobulin classes in Nigerian cigarette smokers: Indication for increased risk of oral diseases. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012; 9(5): 531-4.
71. Patel RA, Wilson RF, Palmer RM. The effect of smoking on periodontal bone regeneration: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2012; 83(2): 143-55.
72. Pavone C, Perussi LR, de Oliveira GJ, Scardueli CR, Cirelli JA, Cerri PS, et al. Effect of Er,Cr:YSGG laser application in the treatment of experimental periodontitis. *Lasers Med Sci*. 2014 Jan 30. [Epub ahead of print]
73. Perussi LR, Pavone C, de Oliveira GJ, Cerri PS, Marcantonio RA. Effects of the Er,Cr:YSGG laser on bone and soft tissue in a rat model. *Lasers Med Sci*. 2012; 27(1): 95-102.

74. Preber H, Bergstrom J. Cigarette smoking in patients referred for periodontal treatment. *Scand J Dent Res*. 1986; 94(2): 102-8.
75. Preber H, Bergstrom J, Linder LE. Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. *J Clin Periodontol*. 1992; 19(9 Pt 1): 667-71.
76. Raulin LA, McPherson JC, 3rd, McQuade MJ, Hanson BS. The effect of nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surfaces in vitro. *J Periodontol*. 1988; 59(5): 318-25.
77. Rawlinson A, Grummitt JM, Walsh TF, Ian Douglas CW. Interleukin 1 and receptor antagonist levels in gingival crevicular fluid in heavy smokers versus non-smokers. *J Clin Periodontol*. 2003; 30(1): 42-8.
78. Rezavandi K, Palmer RM, Odell EW, Scott DA, Wilson RF. Expression of ICAM-1 and E-selectin in gingival tissues of smokers and non-smokers with periodontitis. *J Oral Pathol Med*. 2002; 31(1): 59-64.
79. Rothem DE, Rothem L, Dahan A, Eliakim R, Soudry M. Nicotinic modulation of gene expression in osteoblast cells, MG-63. *Bone*. 2011; 48(4): 903-9.
80. Schwarz F, Aoki A, Becker J, Sculean A. Laser application in non-surgical periodontal therapy: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2008; 35(8 Suppl): 29-44.
81. Schwarz F, Sculean A, Berakdar M, Szathmari L, Georg T, Becker J. In vivo and in vitro effects of an Er:YAG laser, a GaAlAs diode laser, and scaling and root planing on periodontally diseased root surfaces: a comparative histologic study. *Lasers Surg Med*. 2003; 32(5): 359-66.

82. Sharma A, Brody AL. In vivo brain imaging of human exposure to nicotine and tobacco. *Handb Exp Pharmacol.* 2009; (192): 145-71.
83. Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RF, Garcia VG, Marcantonio EJ. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. *J Oral Sci.* 2003; 45(1): 17-23.
84. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol.* 1992; 63(4 Suppl): 322-31.
85. Sohn DS, Lee JS, An KM, Romanos GE. Erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser-assisted sinus graft procedure. *Lasers Med Sci.* 2009; 24(4): 673-7.
86. Solomon HA, Priore RL, Bross ID. Cigarette smoking and periodontal disease. *J Am Dent Assoc.* 1968; 77(5): 1081-4.
87. Stoltenberg JL, Osborn JB, Pihlstrom BL, Herzberg MC, Aepli DM, Wolff LF, et al. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. *J Periodontol.* 1993; 64(12): 1225-30.
88. Sulieman M. An overview of the use of lasers in general dental practice: 1. Laser physics and tissue interactions. *Dent Update.* 2005; 32(4): 228-30.
89. Susin C, Dalla Vecchia CF, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *J Periodontol.* 2004; 75(7): 1033-41.

90. Tanur E, McQuade MJ, McPherson JC, Al-Hashimi IH, Rivera-Hidalgo F. Effects of nicotine on the strength of attachment of gingival fibroblasts to glass and non-diseased human root surfaces. *J Periodontol.* 2000; 71(5): 717-22.
91. Ting CC, Fukuda M, Watanabe T, Aoki T, Sanaoka A, Noguchi T. Effects of Er,Cr:YSGG laser irradiation on the root surface: morphologic analysis and efficiency of calculus removal. *J Periodontol.* 2007; 78(11): 2156-64.
92. Tomar SL, Asma S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol.* 2000; 71(5): 743-51.
93. Tsurumaki Jdo N, Souto BH, Oliveira GJ, Sampaio JE, Marcantonio Junior E, Marcantonio RA. Effect of instrumentation using cures, piezoelectric ultrasonic scaler and Er,Cr:YSGG laser on the morphology and adhesion of blood components on root surfaces: a SEM study. *Braz Dent J.* 2011; 22(3): 185-92.
94. van As G. Erbium lasers in dentistry. *Dent Clin North Am.* 2004; 48(4): 1017-59.
95. van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(11): 1023-8.

96. Vlachojannis C, Dye BA, Herrera-Abreu M, Pikdoken L, Lerche-Sehm J, Pretzl B, et al. Determinants of serum IgG responses to periodontal bacteria in a nationally representative sample of US adults. *J Clin Periodontol.* 2010; 37(8): 685-96.
97. Wang X, Ishizaki NT, Suzuki N, Kimura Y, Matsumoto K. Morphological changes of bovine mandibular bone irradiated by Er,Cr:YSGG laser: an in vitro study. *J Clin Laser Med Surg.* 2002; 20(5): 245-50.
98. Ward KD, Klesges RC. A meta-analysis of the effects of cigarette smoking on bone mineral density. *Calcif Tissue Int.* 2001; 68(5): 259-70.
99. WHO urges more countries to require large, graphic health warnings on tobacco packaging: the WHO report on the global tobacco epidemic, 2011 examines anti-tobacco mass-media campaigns. *Cent Eur J Public Health.* 2011; 19(3): 133-51.
100. Williams RC. Periodontal disease. *N Engl J Med.* 1990; 322(6): 373-82.
101. Yamano S, Berley JA, Kuo WP, Gallucci GO, Weber HP, Sukotjo C. Effects of nicotine on gene expression and osseointegration in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21(12): 1353-9.
102. Yavari HR, Rahimi S, Shahi S, Lotfi M, Barhaghi MH, Fatemi A, et al. Effect of Er, Cr: YSGG laser irradiation on *Enterococcus faecalis* in infected root canals. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28 (Suppl 1): 91-6.

103. Yu DG, Kimura Y, Kinoshita J, Matsumoto K. Morphological and atomic analytical studies on enamel and dentin irradiated by an erbium, chromium:YSGG laser. *J Clin Laser Med Surg.* 2000; 18(3): 139-43.
104. Zambon JJ, Grossi SG, Machtei EE, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol.* 1996; 67(Suppl 10): 1050-4.

Anexos



Anexo 1 – Aprovação do comitê de ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEEA nº 22/2009

Araraquara, 10 de fevereiro de 2010

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em 09/02/2010, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Avaliação dos efeitos do laser Er,Cr:YSGG em defeitos ósseos críticos e no tratamento de doença periodontal induzida em ratos submetidos à inalação de fumaça de cigarro" (Proc. CEEA nº 22/2009) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para JUNHO/2014.

Atenciosamente.

Eleny Zanella Balducci
Profª Drª ELENY ZANELLA BALDUCCI
Coordenadora do CEEA

Ao
Prof. Dr. ÉLCIO MARCANTONIO JUNIOR
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 27/03/2017

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 27 de março de 2014

Chaine Pavone