



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Livia Rodrigues Perussi

**“AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO DE FERIDAS
CUTÂNEAS E ÓSSEAS REALIZADAS POR
TÉCNICAS CONVENCIONAIS E COM LASER DE
Er,Cr:YSGG.
ESTUDO EM RATOS.”**

ARARAQUARA

2010

Livia Rodrigues Perussi

**“AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO DE FERIDAS
CUTÂNEAS E ÓSSEAS REALIZADAS POR
TÉCNICAS CONVENCIONAIS E COM LASER
DE Er,Cr:YSGG. ESTUDO EM RATOS.”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Periodontia – da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, para o título de **MESTRE** em Odontologia.

***Orientadora:** Prof^ª. Dr^ª. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio*

ARARAQUARA

2010

Perussi, Livia Rodrigues

Avaliação da reparação de feridas cutâneas e ósseas realizadas por técnicas convencionais e com laser de Er, Cr: YSGG. Estudo em ratos / Livia Rodrigues Perussi. – Araraquara: [s.n.], 2010.

106 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora : Profa. Dra. Rosemary Adriana C. Marcantonio

1. Lasers 2. Cicatrização de feridas 3. Osteotomia I. Título

Livia Rodrigues Perussi

**“AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO DE FERIDAS
CUTÂNEAS E ÓSSEAS REALIZADAS POR
TÉCNICAS CONVENCIONAIS E COM LASER DE
Er,Cr:YSGG.
ESTUDO EM RATOS.”**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof^ª. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio
(FOAr – UNESP)

2º examinador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório (FOAr – UNESP)

3º examinador: Prof^ª. Dra. Leticia Theodoro (UNIFEB)

Araraquara, 10 de março de 2010.

DADOS CURRICULARES

Livia Rodrigues Perussi

NASCIMENTO: 06/01/1983 (São Carlos, SP)

FILIAÇÃO: Sergio Perussi Filho
Janice Rodrigues Perussi

2003 - 2006: **Curso de Graduação em Odontologia**
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP,
São Paulo, Brasil.

2007 - 2008: **Especialização em Periodontia**
Associação Paulista de Cirurgiões Dentista, APCD –
Araraquara, São Paulo, Brasil.

2008 - atual: **Pós-Graduação em Periodontia – Nível Mestrado**
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP,
São Paulo, Brasil.

Dedicatória

À Deus...

Por sempre estar ao meu lado, me protegendo e me reconfortando, me dando serenidade, paciência e perseverança nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais.....

À minha mãe, **Janice**, por ter sempre me dado amor, carinho e educação. Sua dedicação como mãe e profissional é motivo de muito orgulho para mim. Você é a principal razão de ter chegado aqui e meu exemplo de mulher a ser alcançado.

Ao meu pai, **Sérgio**, por sempre ter me estimulado e nunca ter medido esforços para que chegasse onde estou. Admiro todo seu empenho e garra para alcançar seus objetivos e agradeço por poder compartilhá-los com você. Tenho muito orgulho de ser sua filha.

Amo muito vocês!

Ao meu namorado...

Guiga, com você ao meu lado esta etapa se tornou muito mais prazerosa. Em você encontrei carinho, inspiração e estímulo para continuar com muito mais confiança e serenidade. Obrigada pelo apoio e incentivo que sempre depositou em mim. Só tenho a agradecer por você fazer parte da minha vida. Ao seu lado, você me faz querer ser sempre uma pessoa melhor...te amo muito.

Ao meu irmão...

Du, obrigada pela paciência, carinho e companheirismo nesta minha etapa. É muito bom saber que posso contar com você em minha vida.

Aos meus familiares....

Obrigada por sempre depositarem confiança em mim. Em especial à minha avó Dora, por sempre me benzer nas horas mais difíceis!! Amo todos vocês.

Agradecimentos especiais

À Prof^ª. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio...

Orientadora deste trabalho e grande exemplo de vida e dedicação profissional. Admiro muito seu caráter e profissionalismo. Agradeço por todas as oportunidades de aprendizado e esforços a mim dispensados ao longo destes anos. Obrigada pela paciência, incentivo e carinho pelo qual trata a mim e seus demais orientandos. Você é muito querida.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em nome do Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla e sua vice-diretora Prof^a. Dra. Andréia Afonso Barreto Montandon.

Ao atual Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em nome do Prof. Joni Augusto Cirelli (coordenador) e do Prof. Mario Tanomaru Filho (vice-coordenador).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos docentes da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: Prof^a. Dra. Silvana Regina Perez Orrico, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior e ao Prof. Dr. Carlos Rossa Junior. Agradeço por todo aprendizado, paciência, dedicação e amizade que me oferecem desde a graduação.

Ao Prof. Dr. Paulo Sergio Cerri, professor da disciplina de Histologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, um agradecimento especial por toda a dedicação dispensada nas avaliações histológicas deste trabalho. Obrigada por todo tempo e conhecimento transmitido. Sem você, a conclusão deste trabalho não seria possível.

À Prof^a. Dra. Leticia Helena Theodoro por toda sua ajuda na elaboração deste projeto e na freqüente eliminação das minhas dúvidas!

Aos demais professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por todo conhecimento, apoio e companheirismo a mim dedicados.

À Claudinha (Ana Cláudia Gregolin Costa Miranda), auxiliar do laboratório de histologia da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, um agradecimento especial por todo o ensinamento referente aos procedimentos histológicos. Sempre com muita paciência me transmitiu todo seu conhecimento adquirido através de anos de prática. Obrigada por estar sempre de prontidão para me ajudar. Tenho um carinho muito grande por você.

À Regina Lúcia, secretária da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por toda atenção a nós dispensada. Obrigada por toda a sua dedicação e competência em resolver os nossos mais diversos problemas, facilitando muito a nossa vida sempre!

Aos demais funcionários da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: Maria do Rosário, Zezé e Esther por sempre facilitarem nossos compromissos dentro da clínica, estando sempre dispostas a nos ajudar. Vocês são muito queridas.

Ao Pedrinho, funcionário da disciplina de Histologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pelos cuidados com os animais no biotério. A sua ajuda foi muito importante.

À todos os funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP por toda dedicação ao longo desses anos.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: Mara, Rosangela, José Alexandre e Flávia, por toda a paciência e suporte durante estes 2 anos.

Aos demais funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por todo o bom funcionamento desta instituição.

Agradecimento especial aos meus amigos de pós-graduação em Periodontia Chaine, Guilherme e Rafael Faeda, por toda a ajuda na parte experimental e laboratorial deste trabalho. Sem vocês, não conseguiria chegar até aqui. Muito obrigada!

Aos meus demais colegas de pós-graduação em Periodontia: Alliny, Leila, Mariana, Andressa, Telma, Michelle, Sâmia, André, João, Lucas, Sabrina, Marina, Nicole, Cássia, Roberta, Naná, Yeón, Shelon, Morgana, Rodrigo, Rubinho, Nicolau, Andrés, Wagner e Humberto, pelos bons momentos vividos e pelas experiências e conhecimento compartilhados.

Aos meus queridos amigos de São Carlos, Júlia, Cecé, Gui Botta, Taísa, Dani, Marco, Roberta, Dudu, Caio, Piga, Mônica, Pamela e Fabiana, por continuarem sendo meus amigos, mesmo me ausentado em alguns momentos!

Às minhas queridas amigas de graduação Ana, Isis e Luciana por sempre me apoiarem mesmo estando distantes. Amo vocês!

..... E à todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, os mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. PROPOSIÇÃO.....	35
3. Estudo I	35
3.1 - MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.2 - RESULTADOS.....	43
4. Estudo II	58
4.1 - MATERIAL E MÉTODOS.....	58
4.2 - RESULTADOS.....	69
5. DISCUSSÃO.....	84
6. CONCLUSÃO.....	91
7. REFERÊNCIAS.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

CO₂ – Gás carbônico

HeNe – Hélio e neônio

GaAs – Arseneto de gálio

InGaAsP – *Indium gallium arsenide phosphide*

ArF – *Argon Fluoride*

XeCl – *Xenon Chloride*

Nd:YAG – Neodímio: ítrio, alumínio, garnet

Ho:YAG – Hólmio: ítrio, alumínio, garnet

Ho:YSGG – Hólmio: ítrio, scandio, gálio, garnet

Er:YAG – Érbio: ítrio, alumínio, garnet

Er,Cr:YSGG – Érbio, Cromo: ítrio, scandio, gálio, garnet

μm – Micrômetros

mm – Milímetros

cm – Centímetros

μs – Microsegundos

s – Segundos

g – Gramas

W – Watts

Hz – Hertz

mJ – Mili-Joule

ml – Mili-litro

RAR – Raspagem e alisamento radicular

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra acético

Perussi, LR. Avaliação da reparação de feridas cutâneas e ósseas realizadas por técnicas convencionais e com laser de Er,Cr:YSGG. Estudo em ratos. [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

Resumo

O laser cirúrgico de Er,Cr:YSGG (érbio, impregnado por cromo: ítrio, scandio, gálio, garnet) tem sido utilizado no tratamento cirúrgico periodontal, embora poucos estudos histológicos sejam encontrados na literatura.

O objetivo deste estudo foi comparar histologicamente a utilização do laser de Er-Cr: YSGG em tecido mole e ósseo em relação à técnicas cirúrgicas convencionais.

Foram utilizados 20 ratos, divididos aleatoriamente em 3, 7, 15 e 30 dias, com 5 animais por período. Em cada animal foram realizados os procedimentos (P) nas regiões de dorso e calota, respectivamente: PI) Incisão no dorso com bisturi de lâmina nº 15; PII) Incisão no dorso com Laser Er,Cr:YSGG (150mJ de energia, 2.0W de potência), PIII) Defeito ósseo na calota com fresa diamantada esférica em baixa rotação sob refrigeração; PIV) Defeito ósseo na calota com Laser Er,Cr:YSGG (150mJ de energia, 3.0W de potência). Os procedimentos foram randomicamente distribuídos entre lado direito e esquerdo de cada animal. A análise histológica foi avaliada de acordo com a intensidade da resposta inflamatória, presença de áreas necróticas e processo de regeneração tecidual. A análise histométrica dos defeitos ósseos foi confirmada pelo teste estatístico

paramétrico ANOVA e complementado pelo teste Bonferroni.

Para os procedimentos na região de dorso pode-se observar que nos períodos iniciais houve melhor resposta histológica para o PI, embora no período de 30 dias os procedimentos I e II apresentavam resultados semelhantes. A análise histométrica confirmou uma maior formação óssea na calota com o uso do laser de Er,Cr:YSGG aos 30 dias ($79.96 \pm 10.30\%$) em relação ao procedimento com fresa aos 15 ($62.05 \pm 4.84\%$) e 30 dias ($58.23 \pm 9.99\%$). Na análise histológica em tecido duro, observou-se necrose óssea superficial no PIV em todos os períodos, mas aos 30 dias a formação óssea foi mais evidente no PIV comparado ao PIII.

Pode-se concluir que a utilização do laser de Er,Cr:YSGG em tecido mole acarreta atraso na cicatrização, mas que após 30 dias não há diferença entre PI e PII. Aos 30 dias a formação óssea foi estatisticamente maior no PIV quando comparado ao PIII.

Palavras-chave: Lasers; cicatrização de feridas; osteotomia.

Perussi, LR. Histological evaluation of incisions produced by Er,Cr:YSGG laser in rat soft and hard tissues. [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

Abstract

The Er,Cr:YSGG (*Erbium, Chromium:Yttrium–Scandium–Gallium–Garnet*) surgical laser has been demonstrated as an useful instrument on dentistry since its wavelength (2,78 μ m) is strongly absorbed by water and hydroxyapatite.

The aim of this study was to histologically compare the *in vivo* healing process that occurs in soft and hard tissues incisions made by Er,Cr:YSGG laser or conventional periodontal surgeries techniques.

Twenty rats were used and divided into 4 groups of 5 different periods. On each animal was performed the following procedures (P) in the soft and hard tissue: PI) dorsum incision with scalpel number 15; PII) dorsum irradiation with 2.0W Er,Cr:YSGG laser; PIII) skull defect made by a diamond spherical bur with water refrigeration; PIV) skull defect created by 3.0W Er,Cr:YSGG laser. The procedures were randomly distributed into right and left side of each animal. After sacrifice 3, 7, 15 and 30 days post-surgery the histological examinations were performed. Histometric analysis of the bone defects was confirmed by the parametric statistic test ANOVA and complemented by the Bonferroni test.

In the first periods, the histological findings in the dorsum were better in the PI group, although by day 30 PI and PII showed similar healing response. The procedures in the skull revealed superficial necrosis in all periods in the PIV

group, although this group had much more evidence of bone formation at day 30 than PIII. The histometric analysis also confirmed a better tissue response for laser application in the skull than conventional techniques, with $79.96\pm 10.30\%$ bone formation by day 30 with Er,Cr:YSGG laser and $62.05\pm 4.84\%$ by day 15 and $58.23\pm 9.99\%$ by day 30 with bur.

The utilization of Er,Cr:YSGG laser in soft tissue caused a minimal delay in the healing initial periods but the subsequent tissue remodeling was favorable. Its use on hard tissue revealed statistically greater bone formation than conventional surgeries techniques. Thus, the Er,Cr:YSGG laser is a promising surgical instrument with minimal thermal damage to adjacent tissues *in vivo*.

Keywords: Lasers; wound healing; osteotomy.

1. Introdução

Atualmente existe um consenso mundial de que o tratamento não cirúrgico deve ser o procedimento de escolha inicial para manutenção dos tecidos de suporte dos dentes. Muitas vezes, no entanto, o profissional opta pela realização de procedimentos cirúrgicos a fim de alcançar saúde e estética^{29,38}.

Terapias envolvendo cirurgias odontológicas convencionais geralmente incluem o uso de curetas para debridamento de tecido mole e cinzéis cirúrgicos para reconstruir irregularidades ósseas. Instrumentos convencionais utilizados para cirurgias ósseas orais podem causar necrose térmica, liberação de partículas em aerossóis e limitação de profundidade e acesso⁷⁶.

A fim de suprir as intercorrências que possam ocorrer nestas cirurgias, pesquisadores trabalham em busca de novos meios operacionais para controlar estes fatores.

Dentre as novas tecnologias encontradas no mercado estão os lasers, os quais foram introduzidos na odontologia em meados da década de 60 a partir da criação do laser de rubi pelo americano Theodoro Maiman. Desde então, surgiu uma nova era na área de prevenção e terapêutica, tanto na medicina quanto na odontologia^{1,4,45}. Stern & Sogannaes foram os pioneiros na utilização do laser de rubi no campo da odontologia, despertando grande interesse em toda a comunidade acadêmica⁶⁷.

LASER é uma palavra acrônima, com origem na língua inglesa, *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação). Esta energia luminosa emite uma radiação eletromagnética não ionizante com um padrão idêntico, propagando-se em trajetórias, direção, sentido, amplitude e fase análogos. Portanto, é uma luz de cor pura¹.

O laser possui características bem definidas como coerência, monocromaticidade e colimação. A coerência significa que a luz apresenta ondas em sincronia, diferentemente das lâmpadas comuns. O laser é monocromático pois a luz é emitida sempre com o mesmo comprimento de onda, distinguindo-se, então, das lâmpadas fluorescentes e, colimado, pois emite raios paralelos, irradiando um único ponto⁴. Por isso, sua direcionalidade e a alta densidade de energia encontram-se concentradas em pequenos pontos. Deste modo, trata-se de um tipo de fonte luminosa bastante distinta das demais fontes luminosas como lâmpadas comuns ou luz fluorescente¹. Além disso, este tipo de luz não é encontrado em lugar algum da natureza⁴.

Estes equipamentos a base de laser apresentam três regimes de operação: contínuo, pulsado ou interrompido, representando a frequência de pulso de cada laser, o que significa o modo pelo qual a força do laser é liberada em um determinado tempo^{1,4}.

Quando a luz laser alcança o tecido, ela pode ser refletida, espalhada, absorvida ou retransmitida aos tecidos vizinhos^{1,4}, de acordo com a figura 1:



FIGURA 1 - Efeitos tissulares dos lasers.*

O coeficiente de absorção do laser é dependente do comprimento de onda e a presença de moléculas livres de água, proteínas, pigmentos e outras macromoléculas. Em interações que envolvam calor, a absorção de moléculas de água é de extrema importância⁴.

Para a produção da luz laser, são necessárias algumas condições especiais: é necessário um meio ativo (gasoso, sólido ou semi-sólido), que gere luz quando excitado por uma fonte de energia externa. Esse processo denominado bombeamento transforma o meio ativo em meio amplificador de radiação através do fenômeno denominado Inversão de População. Neste processo, elétrons absorvem a energia bombeada e saltam para um nível de energia mais externo e maior. Quando estes elétrons saltam de uma camada de valência de um nível energético alto (estado metaestável) a outra com nível energético menor (energia original), liberam uma quantidade de energia em forma de luz altamente

* Aoki A, *et al.* Lasers in nonsurgical laser therapy. *Periodontol* 2000. 2004; 36: 59-97.

concentrada conhecida como fóton. Este fóton acaba estimulando todos os demais átomos em estado metaestável, gerando um processo em cascata e com crescimento em progressão geométrica que resulta na emissão estimulada de radiação^{4,7}.

Desde o advento do laser de rubi em 1960, diversas pesquisas vem sendo conduzidas para avaliar os efeitos de lasers de diferentes meios ativos na odontologia, como os lasers a gás (CO₂; HeNe), a diodo (GaAs, InGaAsP), os excímeros (ArF, XeCl) e os lasers em estado sólido (Nd:YAG; Ho:YAG e Er:YAG)^{4,35}. Cada laser opera num comprimento de onda específico e irradia uma cor no espectro eletromagnético⁴, de acordo com a figura 2:

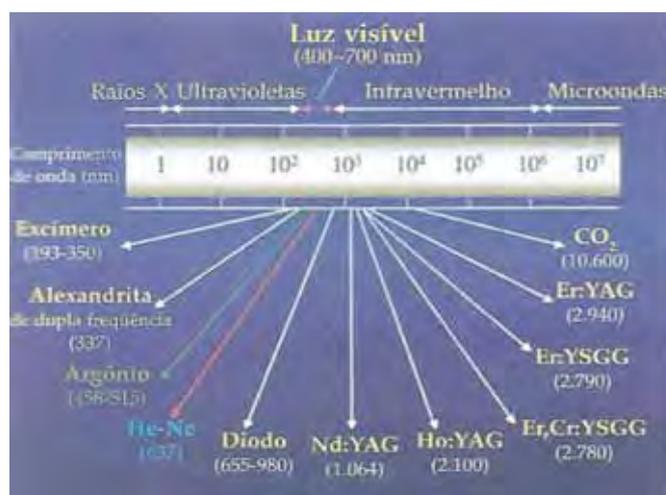


FIGURA 2 - Espectro eletromagnético e comprimento de onda dos lasers.**

As características do laser dependem de seu comprimento de onda e existem dois grandes grupos de lasers utilizados em odontologia, classificados de acordo com o mecanismo de interação com os tecidos. O laser de baixa

** Aoki A, *et al.* Lasers in nonsurgical laser therapy. *Periodontol* 2000. 2004; 36: 59-97.

intensidade ou laser terapêutico, apresenta propriedades analgésicas, antiinflamatórias (aliviando edema e hiperemia) e de bioestimulação tecidual, além de promover redução bacteriana por meio de fotossensibilização e agir em parestesias e paralisias^{1,64}. Já o laser de alta intensidade ou laser cirúrgico, promove uma interação fototérmica ou fotomecânica com os tecidos podendo ser utilizado em cirurgias com vantagens superiores ao uso do bisturi convencional principalmente pelo seu efeito hemostático^{8,19,24}. Assim, o desenvolvimento dos lasers cirúrgicos oferece novas possibilidades frente à instrumentos cirúrgicos convencionais⁴¹. No entanto, cirurgias com lasers podem causar risco de enfisema pela alta pressão de água e ar e risco de infecção pelo espalhamento de bactérias, restringindo sua ampla utilização⁷⁶. Deste modo, a correta escolha dos parâmetros utilizados para cirurgia em diferentes aplicações e tecidos é de fundamental importância para que haja sucesso operatório e se evite efeitos colaterais indesejáveis.

Os lasers de baixa e alta intensidade possuem as mesmas características de radiações ópticas, porém, com comprimento de onda e finalidades específicas, podendo ser denominados também de lasers de alta e baixa potência, uma vez que é basicamente a potência que os tornam terapêuticos ou cirúrgicos¹.

Os lasers de baixa intensidade são hoje um equipamento bastante comum nos consultórios dentários. Além do grande embasamento científico que estes lasers terapêuticos possuem, apresentam também alta eficácia, baixo custo e objetividade e simplicidade nos procedimentos terapêuticos aos quais se destinam¹.

Atualmente diversos estudos com lasers de alta potência vêm sendo realizados nas mais diversas áreas da odontologia¹⁶, como na dentística^{28,34,46}, na odontopediatria^{37,50}, na periodontia^{4,15,27,32,47,52,72-73}, na cirurgia^{5,13,31,35,77}, na endodontia^{6,74} e na implantodontia^{49,58,66}.

Os lasers de alta intensidade têm sido utilizados em periodontia para promover redução bacteriana em bolsas periodontais^{2,8,55} e alguns autores têm avaliado o efeito desta irradiação em procedimentos de raspagem e alisamento radicular (RAR), assim como os efeitos causados na superfície radicular^{3,15,32,52,71,73}.

Tendo em vista o comprimento de onda do laser de Er,Cr:YSGG (2,78 μ m) e o espectro de maior absorção de água (entre 2,7 a 3,2 μ m)⁴ - Figura 3 - é de extremo interesse que este laser atue como instrumento de cirurgias em tecidos moles e duros.

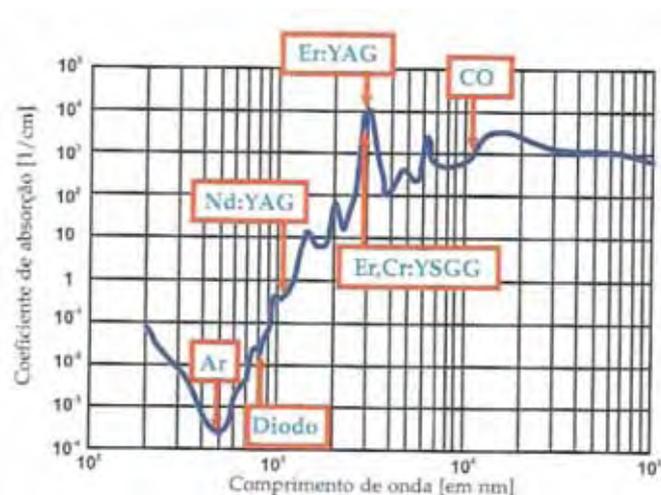


FIGURA 3 - Espectro absorção água/comprimento de onda dos lasers.***

*** Aoki A, *et al.* Lasers in nonsurgical laser therapy. *Periodontol* 2000. 2004; 36: 59-97.

Nas cirurgias periodontais, o que se espera dos lasers cirúrgicos é a capacidade de ablacionar tecidos moles e duros e coagular vasos sanguíneos causando hemostasia e mínimos efeitos térmicos⁴¹. No entanto, devido à alta potência emitida por estes lasers, pode ocorrer carbonização dos tecidos circunvizinhos aos tecidos duros⁴.

O laser de Er:YAG (érbio: ítrio, alumínio, garnet) foi introduzido em 1974 como um laser que, dentre todos os lasers infravermelhos existentes, apresenta o comprimento de onda (2,94µm) mais próximo à maior banda de absorção da água, sendo assim indicado para tratamento em tecidos moles e duros⁴.

Desde então, este tipo de laser vem sendo utilizado e extensamente estudado na remoção de cáries e preparos cavitários^{9,18,22,54}, tratamentos endodônticos^{30,36,39-40,48}, remoção de cálculo em esmalte e dentina^{3,12,19,24,71}, cirurgias de tecido mole^{26,44}, remoção cirúrgica de tecido ósseo^{59-60,69}, associado à raspagem com instrumentos manuais⁴²⁻⁴³ e em implantodontia^{33,68,70}. No entanto, a geração de calor provocada pelo uso deste equipamento compromete os tecidos circunvizinhos, principalmente em se tratando de tecidos duros⁴. Assim, alguns estudos mostram que o uso adjunto de água com a aplicação deste tipo de laser resulta em menores danos térmicos à estrutura dentária^{11,25,75}.

A fim de contornar os problemas de carbonização de lasers cirúrgicos, recentemente foi desenvolvido em odontologia o laser infravermelho de Er,Cr:YSGG (cristais de érbio, impregnado por cromo: ítrio, scandio, gálio, garnet). A energia deste laser interage com os íons hidroxila (OH⁻) da água na interface dos tecidos, sendo conhecido como um sistema hidrocínético, causando

a vaporização dos tecidos^{4,35,76}. O laser de Er,Cr:YSGG tem como parâmetros 20Hz de frequência, 2,78 μ m de comprimento de onda, emissão pulsada com duração de 140-150 μ s e potência ajustável entre 0 e 6W*. O Waterlase® apresenta como diferencial uma fibra óptica que termina numa peça de mão com um cristal de safira que é banhado num sistema de *spray* ar-água que pode ser ajustado entre 0 e 100%.

Em meados da década de 90, o laser de Er,Cr:YSGG foi introduzido como um equipamento seguro para ser usado em tecidos moles e duros, tendo como suporte diversos estudos publicados revelando seus efeitos benéficos^{16,27,31,32,35,63,73,76-77}. Através do seu sistema hidrocínético no qual interage com moléculas de água nos tecidos, oferece a vantagem de produzir cortes corretos, remoção cirúrgica precisa e eficiência tanto em tecidos moles como em duros, causando mínimos danos térmicos aos tecidos adjacentes^{16,17,57}. Além disso, é o primeiro sistema que apresenta uso clínico significativo em cirurgias de tecido duro, gerando grande promessa em relação à preparos cavitários e colocação de implantes¹⁶. De acordo com Wang *et al*⁷⁷, em 2005, este laser pode ser utilizado em algumas cirurgias orais menores, como fenestrações, drenagem de abscessos periapicais e apicectomias.

Em 2001 o laser de Er,Cr:YSGG, de alta intensidade, foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) americano para uso em incisão, excisão, vaporização, ablação e coagulação de tecidos moles orais²⁰. Em 2002, o mesmo

* De acordo com o manual do fabricante.

laser foi liberado para procedimentos cirúrgicos em tecido duro como corte ósseo, raspagem e ressecção²¹.

Apesar de seu uso clínico já estar bem estabelecido, o laser de Er,Cr:YSGG ainda necessita de muitos estudos referentes à sua extensa aplicabilidade. Na periodontia, suas principais indicações são: biópsias de tecido mole, analgesia frente à lesões herpéticas e úlceras aftosas, frenectomias, gengivectomias e aumentos de coroa clínica*.

Em 1995, Eversole & Rizoio¹⁶, publicaram os primeiros relatos com o laser de Er,Cr:YSGG. Os autores utilizaram este laser para colocação de implantes em coelhos; corte dentário com e sem exposição de tecido pulpar e preparos cavitários de dentes humanos extraídos. Concluíram que a colocação de implantes era possível e permitia a osseointegração assim como cirurgias de tecidos duros em osso e esmalte. Os dentes respondiam sem inflamação mesmo quando o tecido pulpar era exposto, uma vez que ocorria um selamento a partir do coágulo formado no tecido conjuntivo. Com relação aos preparos cavitários, embora tenham observado que o corte do laser não era tão preciso quanto uma fresa, os preparos podiam ser melhorados em situações limitadas de instrumentação. Além disso, as respostas histológicas demonstravam o potencial de utilização do laser de Er,Cr:YSGG em tecidos moles.

Desde então, os artigos publicados em periodontia são em sua maioria referentes a avaliações de alterações morfológicas em esmalte e dentina^{15,61,63,73},

* De acordo com o manual do fabricante.

como adjunto da terapia básica³², em comparação à instrumentos ultrasônicos e instrumentação manual^{27,52} e em relação aos efeitos em tecido ósseo^{35,76,77}.

Estudos utilizando o laser de Er,Cr:YSGG avaliando a eficiência da remoção de depósitos duros sobre a superfície dentária tem demonstrado bons resultados e geram embasamento científico para o uso deste equipamento como substituto de instrumentos manuais.

Kelbaskiene & Maciulskiene³² realizaram um estudo em 2007 onde verificaram a ação do laser de Er,Cr:YSGG como adjunto à terapia básica da doença periodontal. O estudo consistia em um desenho de boca dividida em 10 pacientes com doença periodontal onde foram realizados dois tratamentos: 1) RAR e 2) RAR + laser. Após três meses, foi possível constatar que ambos os tratamentos resultaram em diminuição da profundidade de sondagem (PS). No entanto, concluíram que a associação do laser + RAR teve maior ganho de inserção clínica (1,96±11 e 2,03±11: superfície lingual e vestibular, respectivamente) quando comparado a RAR apenas (0,94±12 e 0,99±14: superfície lingual e vestibular, respectivamente), $p < 0,001$.

Ting *et al*, em 2007⁷³, avaliaram as alterações das superfícies radiculares de dentes submetidos à RAR (raspagem e alisamento radicular) com laser de Er,Cr:YSGG, assim como analisaram o melhor parâmetro de potência utilizada associada à eficiência da remoção do cálculo dentário. Os autores observaram através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) que 1.0W foi suficiente para remoção do cálculo subgingival sem que houvesse alterações morfológicas notáveis.

No mesmo ano, Noori *et al*⁵², compararam os efeitos da irradiação com o laser de Er,Cr:YSGG sobre superfícies radiculares expostas a 1.0W de potência com o grupo onde foi utilizado raspagem com aparelho de ultra-som. Os autores observaram que 95% das amostras expostas ao laser produziram crateras, enquanto em apenas 40% do grupo ultra-som foi encontrado crateras. No entanto, o grupo laser apresentou menos rachaduras.

Hakki *et al*²⁷, em 2009, estudaram os efeitos da instrumentação com o laser de Er,Cr:YSGG comparados à instrumentos manuais ou em associação à aplicação de tetraciclina. Os autores relataram que todos os métodos foram eficientes na remoção dos depósitos de cálculo dos dentes avaliados, no entanto, o uso do laser produzia rugosidade superficial maior do que curetas de Gracey. Além disso, observaram que o conteúdo mineral após irradiação com laser se assemelhava mais ao grupo controle. Assim, concluíram que o uso de 1.5W e pulso de 140 μ s é capaz de realizar procedimentos de RAR com menores efeitos negativos sobre a micro-morfologia da superfície radicular.

Estudos recentemente publicados avaliaram as concentrações de minerais na superfície dentária após irradiação com laser de Er,Cr:YSGG. Em 2009, Secilmis *et al*⁶¹, não observaram diferenças estatisticamente significantes nestas concentrações. No entanto, através de MEV puderam observar que as superfícies se tornavam mais rugosas quanto maior a potência utilizada. Ainda em 2009, Shahabi, Zendedel⁶³, relataram que não foram encontradas diferenças nas proporções de Ca e P (cálcio e fósforo) após irradiação com laser de Er,Cr:YSGG quando comparadas a cavidades preparadas com fresa. Além disso, a MEV

revelou que a superfície dentinária se apresentava limpa, com ausência de *smear layer*, expondo, assim, os túbulos dentinários.

Diante dos lasers de alta potência, alguns trabalhos mostram a vantagem que a adição de água proporciona à morfologia das superfícies dentárias, à eficiência da ablação e também o fato de atingir menores temperaturas pulpare³¹.

No estudo de Kang *et al*³¹, em 2008, os autores avaliaram o efeito de ambientes líquidos sobre a ablação óssea causada pelo laser de Er,Cr:YSGG. O laser foi aplicado em tíbia bovina sobre diferentes condições ambientais: seco, molhado (usando água ou *perfluorocarbon*) e com *spray*. A condição de ambiente molhado com água resultou na mesma quantidade de ablação que o caso seco, só que sem carbonização evidente. Com o *spray*, houve uma maior limpeza do local, mas com uma leve redução na eficiência no poder de corte. No entanto, o *spray* combinado ao laser de Er,Cr:YSGG induziu cortes limpos assistido pela movimentação da água e apenas um pequeno aumento na temperatura do tecido. Assim, os autores concluíram que a ablação com irrigação pode promover efeitos benéficos como grande remoção de material residual, resfriamento e efeitos abrasivos de limpeza durante tratamentos ósseos com o uso deste laser.

Em 2001, Kimura *et al*³⁵, investigaram as mudanças morfológicas, atômicas e de temperatura durante e após a irradiação com laser de Er,Cr:YSGG em tecido ósseo. Além disso, investigaram o efeito de corte, *in vitro*, em osso mandibular canino. O parâmetro de 5W de potência foi o utilizado e o tempo de irradiação foi de 10s em posição fixa e de 30s com a peça óssea em movimento. Como resultado, os autores encontraram produção de buracos regulares ou fendas

com extremidades afiadas e paredes regulares, mas sem derretimento ou carbonização visível. O aumento máximo da temperatura, avaliada através de termografia, foi de 12,6°C para os 30s de irradiação, porém, este aumento durou menos de 10s, não prejudicando, desta maneira, o tecido ósseo. A avaliação analítica por absorção atômica revelou que a proporção cálcio-fósforo não foi significativamente alterada entre área irradiada e não-irradiada, o que sugere que o laser não deve afetar a estrutura óssea remanescente. Assim, concluíram que o laser Er,Cr:YSGG corta osso mandibular canino eficientemente sem queimar ou derreter, mostrando-se uma boa ferramenta para corte de tecidos duros.

Em 2002, Wang *et al*⁷⁶, realizaram um estudo *in vitro* para avaliar as mudanças morfológicas do osso mandibular bovino após irradiação com laser de Er,Cr:YSGG. O parâmetro de 4.0W foi utilizado para comparar os efeitos do laser sobre a superfície óssea quando esta estava em movimento ou afixada e o modo de contato do laser sobre estas superfícies nos diferentes grupos: A) posição fixa e modo de contato; B) posição fixa e sem contato; C) sem fixação e com contato; D) sem fixação e sem contato. A profundidade de perfuração no grupo A foi significativamente maior do que no grupo B ($4,43 \pm 0,49$ mm e $2,81 \pm 0,33$ mm, respectivamente; com $p < 0,01$). Além disso, o grupo A apresentou danos térmicos com até 100µm de espessura, enquanto nos demais grupos os efeitos térmicos foram mínimos, histologicamente não sendo visualizados carbonização nem zonas degenerativas. Deste modo, concluíram que o laser de Er,Cr:YSGG permite um corte ósseo preciso com mínimos efeitos térmicos. No entanto, diferentes métodos

de irradiação podem alcançar diferenças nas taxas de ablação e de efeitos térmicos.

Por fim, Wang *et al*⁷⁷, em 2005, avaliaram o dano imediato e o processo de reparo em tecido mole e duro após perfuração com uso do laser Er,Cr: YSGG em maxila e mandíbula de coelhos. Como parâmetros ajustáveis, utilizaram 2.0W de potência e 10s de irradiação por região. A avaliação histológica foi realizada até 56 dias após irradiação com o laser. Logo após a cirurgia, encontraram sangramento mínimo, o qual foi interrompido com rápida compressa com gaze. Neste mesmo momento, verificou-se histologicamente a presença de carbonização e necrose na superfície do tecido mole assim como um espaço em direção ao osso com infiltrado de eritrócitos, leucócitos e material amorfo protéico-fibroso. No tecido mole, esta área necrótica apresentava 10-40µm em diâmetro. No entanto, no tecido duro, apresentavam de 70-90µm nas zonas danificadas. Comparado ao tecido mole, o osso revelou um dano muito mais severo, revelando uma faixa com carbonização e coagulação necrótica, além de numerosas lacunas osteóticas e trombos nos vasos dos canais Haversianos e de Volkmann. Três dias após a cirurgia, o defeito provocou na mucosa um aspecto de úlcera, além de tecido eritematoso. No tecido mole, uma ponte de epitélio começou a se formar, além de um tecido granulomatoso contendo infiltração leucocitária (neutrófilos) e fibrina. No tecido ósseo ainda persistia majoritariamente a presença de neutrófilos. Após sete dias, a mucosa da área operada havia cicatrizado completamente. O crescimento epitelial era evidente, com vários graus de hiperqueratose. Fibroblastos e células mononucleares foram encontradas na submucosa e o

infiltrado de neutrófilos tinha diminuído. O tecido ósseo da maxila apresentava intenso acúmulo de fibroblastos. Já na mandíbula, o tecido granulomatoso ainda se caracterizava por infiltrado de leucócitos e fibrina. Quatorze dias após, as partículas carbonizadas do tecido mole tinham sido totalmente absorvidas. Fibroblastos se encontravam em orientação horizontal. Os autores observaram formação de osso trabecular na maxila, assim como proeminente formação osteóide nas margens dos defeitos, além de ativação osteoblástica. Na mandíbula, houve intensa proliferação de fibroblastos e a formação de osso novo já havia se iniciado. Vinte e oito dias após a cirurgia, a mucosa exposta ao laser era indistinguível ao tecido adjacente, com exceção que havia alguns fibroblastos remanescentes, mostrando que a reconstrução da fibra colágena ainda não havia terminado. Os defeitos no tecido ósseo haviam diminuído amplamente, sendo substituídos por uma grande quantidade de osso lamelar maturado. No entanto, as partículas carbonizadas remanescentes estavam envoltas por fibroblastos. E, finalmente, após 56 dias, houve o completo preenchimento do defeito ósseo por osso lamelar. As pequenas partículas carbonizadas foram encapsuladas, formando corpos estranhos. Os defeitos ósseos desapareceram e foram totalmente preenchidos por tecido ósseo novo. No entanto, a remodelação na cortical óssea ainda estava ocorrendo. Portanto, os autores concluíram que apesar do laser de Er,Cr:YSGG inicialmente ter causado um atraso na reparação tecidual, este mesmo aparato produziu mínimos efeitos térmicos aos tecidos adjacentes *in vivo*, revelando seu potencial em cirurgias orais menores.

De acordo com a literatura revisada, os resultados encontrados são em sua maioria satisfatórios e impulsionam o interesse de diversos pesquisadores pela busca de novas aplicações do laser Er,Cr:YSGG. Sendo este um laser com parâmetros ajustáveis, ainda são necessários muitos estudos para que se possa chegar a um protocolo de utilização mais adequado e seguro para cada procedimento, buscando, assim, mais eficiência no tratamento e conforto pós-operatório aos pacientes.

2. Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas teciduais inflamatórias e reparativas após uso do laser de Er,Cr:YSGG em tecido mole e ósseo, comparado à instrumentos cirúrgicos convencionais.

Para melhor compreensão desta dissertação, este estudo foi dividido em 2 partes:

- Estudo I: Análise histológica em tecido cutâneo
- Estudo II: Análise histológica e histométrica em tecido ósseo

3. ESTUDO I

3.1 – Material e métodos

COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi primeiramente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, dentro dos regulamentos exigidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sob nº CEEA 11/2008 (Anexo 1).

Avaliação histológica da utilização do laser de Er,Cr:YSGG em tecido mole

AMOSTRA

Neste estudo foram utilizados 20 ratos (*Rattus Norvegicus*), variação *albinus, Holtzman*, adultos jovens, com peso variando entre 200-250g. Os animais foram alojados em gaiolas individuais, tratados com água e ração *ad libitum* antes e durante o período experimental e mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara –UNESP com controle de iluminação e temperatura.

PROCEDIMENTOS PRÉ OPERATÓRIOS

Os animais foram anestesiados por associação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 0,08 ml/100g de massa corporal (Cloridrato de Quetamina – Francotar – Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.) e 0,04 ml/100g de massa corporal (Cloridrato de Xilazina - Virbaxyl 2% - Virbac do Brasil Ind. E Com. Ltda.), respectivamente.

Tiveram o dorso tricotomizados e realizada anti-sepsia do campo cirúrgico com gaze estéril, embebida em solução de clorexidina 2%. Após a anti-sepsia, os animais foram colocados em decúbito ventral para que se pudesse realizar as incisões no dorso dos mesmos (Figura 4).



FIGURA 4 - Região dorsal tricotomizado.

ESPECIFICAÇÕES DO LASER

O laser de Er,Cr:YSGG (*Erbium-Cromium: Ytrium, Scandium, Gallium, Garnet*) – Waterlase, Biolase, USA – (Figura 5) utilizado durante os procedimentos apresenta as seguintes características: 2,78 μ m de comprimento de onda, 20 Hz de frequência, energia de pulso variando entre 0 e 300mJ, potência média ajustável variável entre 0.0 e 6.0 W e emissão pulsada com duração de 140-150 μ s (manual Waterlase). O diâmetro da ponta utilizada neste estudo foi de 600 μ m de diâmetro e 6mm de comprimento. Os parâmetros utilizados foram: 150mJ de energia de pulso e 2.0W de potência, com 50% de emissão de água e ar. A ponta do laser foi mantida perpendicular à região e sem contato com o tecido.



FIGURA 5 - Aparelho laser Er,Cr:YSGG (Waterlase, Biolase – USA).

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Em cada rato foram realizadas randomicamente duas incisões contralaterais na região dorsal (lado direito e esquerdo), sendo uma realizada com lâmina de bisturi nº 15 (Feather Safety Razor Co, Ltda – Japão) e outra com laser de Er,Cr:YSGG. As incisões foram feitas com aproximadamente 1cm de comprimento e em profundidade penetravam somente na derme (tecido epitelial e conjuntivo), evitando perfuração de tecido muscular. Para que não houvesse interferência no processo reparativo dos tecidos, as incisões não foram suturadas.

No total, foram confeccionados cirurgicamente 50 defeitos, distribuídos randomicamente da seguinte maneira:

Tabela 1 - Grupos experimentais do Estudo I

	Imediato	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias	Total de defeitos
Bisturi	5	5	5	5	5	25
Laser Er,Cr:YSGG	5	5	5	5	5	25
Total de defeitos	10	10	10	20	10	50

O modo de realização destes defeitos está ilustrado no esquema 1:



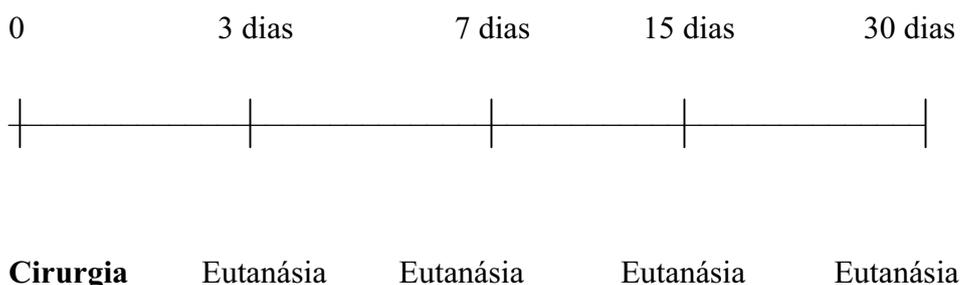
Esquema 1. Imagem ilustrativa do modo de realização das incisões no dorso com bisturi convencional e laser Er,Cr:YSGG

MEDICAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

Após a intervenção cirúrgica foi administrado analgésico (Paracetamol – Medley, Brasil) na concentração de 50mg/100g de peso corpóreo do animal, por via de gavagem, em dose única.

DESENHO EXPERIMENTAL

Cada grupo (bisturi ou laser) foi avaliado em 4 períodos experimentais (3, 7, 15 e 30 dias), com 5 animais em cada grupo, totalizando 20 animais, de acordo com o seguinte desenho experimental:



OBTENÇÃO DAS PEÇAS CIRÚRGICAS

Após os períodos correspondentes aos 3, 7, 15 e 30 dias de pós-operatório, os animais foram sacrificados com sobredose anestésica.

No sacrifício de 30 dias pós-operatório, cinco animais foram aleatoriamente escolhidos para realização de novas incisões (bisturi e laser de Er,Cr:YSGG) no dorso para que estes correspondessem ao grupo de avaliação histológica imediata (período zero).

Para a análise histológica as peças da região do dorso foram removidas imediatamente após a eutanásia com técnica cirúrgica apropriada tomando-se o cuidado de remover a pele adjacente às bordas da ferida e o tecido conjuntivo em sua profundidade. Respeitou-se um limite de segurança de 5cm a partir da incisão para todos os seus lados, de modo que se formou um quadrado como margem de segurança (marcações com caneta para tecido foram utilizadas semanalmente para

limitar as incisões). A seguir, as peças foram colocadas em cassetes plásticos e fixadas em formol a 10% por um período de 24 horas. Após este período, o material foi neutralizado em água corrente por 24h e, em seguida, desidratados numa seqüência de alcoóis em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e absoluto), diafanizados em xilol por 3 horas e finalmente infiltrados por 18 horas e incluídos em parafina, de acordo com a metodologia de rotina empregada no laboratório de Histologia da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

O material processado foi cortado em micrótomo com cortes semi-seriados de 6µm de espessura, divididos em lâminas com 5 cortes cada, totalizando 30 cortes por bloco. O plano de secção dos cortes foi transversal em relação às incisões. As lâminas foram desparafinizadas e rehidratadas para coloração pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) para análise morfológica.

ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA DAS INCISÕES NO DORSO

Por meio de microscopia óptica convencional foram avaliados processos de destruição e reparação tecidual no epitélio e no tecido conjuntivo. Verificou-se a presença de células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos assim como a formação de novos vasos, presença de fibroblastos depositando matriz extracelular e sinais de re-epitelização. Todas as análises foram feitas através de um único examinador treinado e cego para os grupos.

3.2 – Resultados Estudo I

Avaliação histológica da utilização do laser de Er,Cr:YSGG em tecido mole

Para simplificar a compreensão deste trabalho, os resultados serão apresentados de acordo com o período experimental, abrangendo tanto as respostas dos procedimentos com bisturi quanto as respostas dos procedimentos com laser de Er,Cr:YSGG. Além disso, as imagens histológicas selecionadas serão colocadas lado-a-lado. Desta forma, fica visualmente mais fácil avaliar as modificações dos tecidos diante dos dois tratamentos distintos.

- **Período zero (dia do sacrifício):**

BISTURI: As imagens deste período revelam uma incisão nítida e definida atingindo tecido epitelial e conjuntivo (Figura 1).

LASER: Em todas as imagens obtidas, observa-se a presença de carbonização superficial e degeneração tecidual na derme (epitélio e tecido conjuntivo), caracterizado por material amorfo fortemente basófilo (Figuras 2A e 2B).

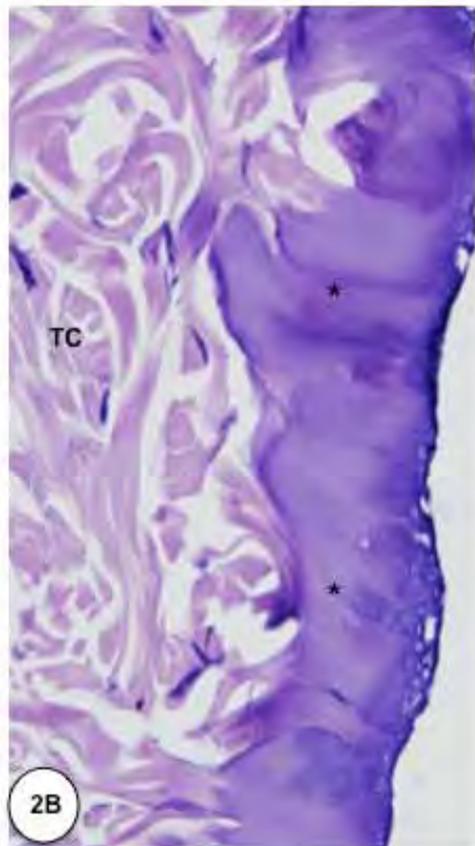
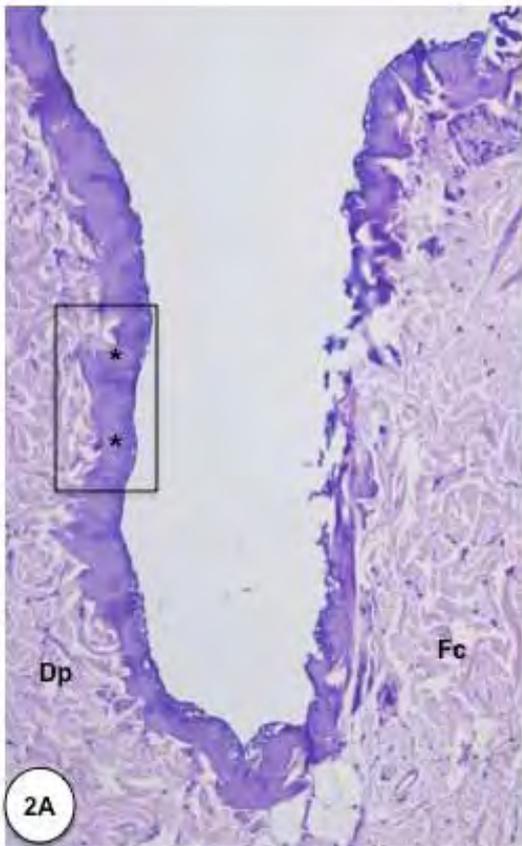
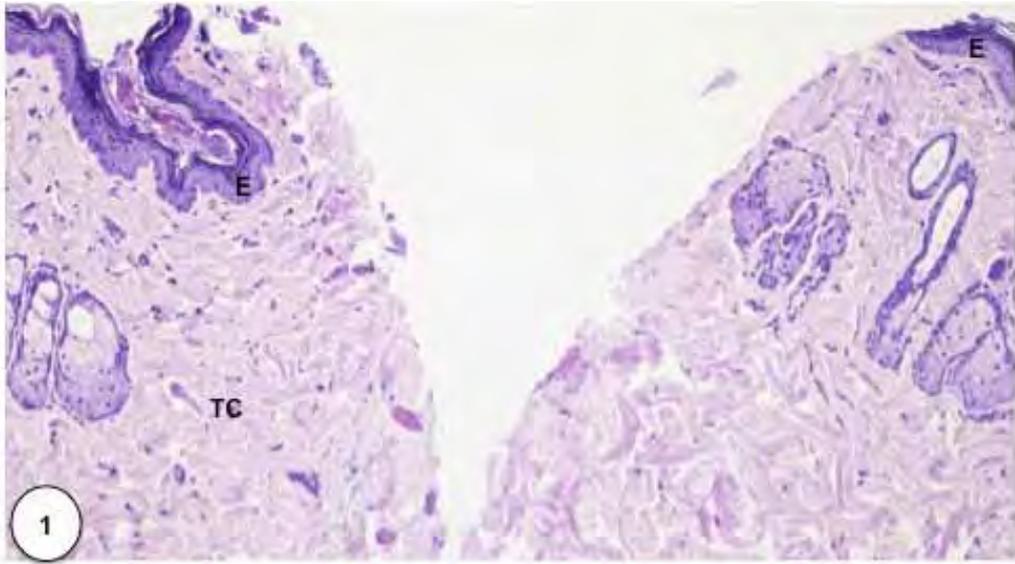


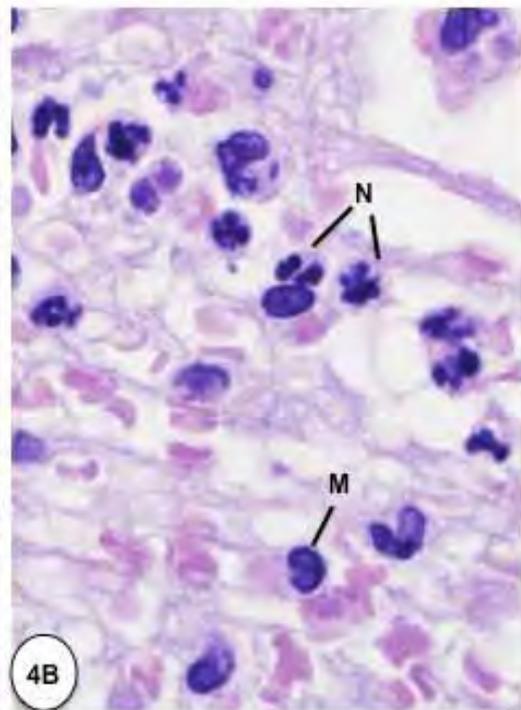
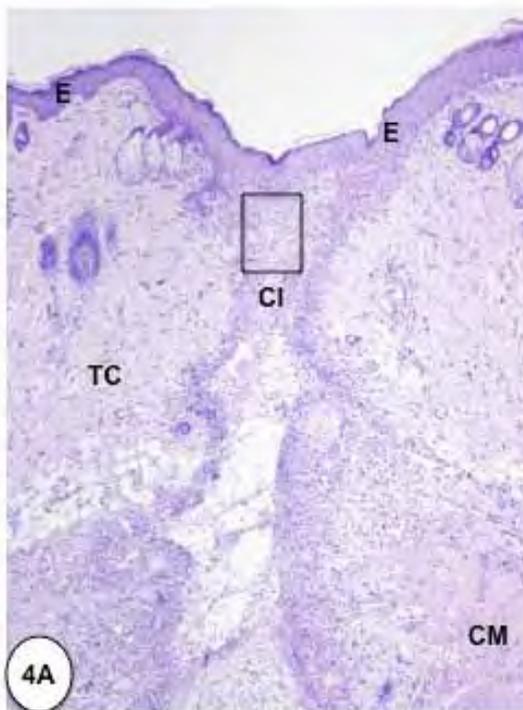
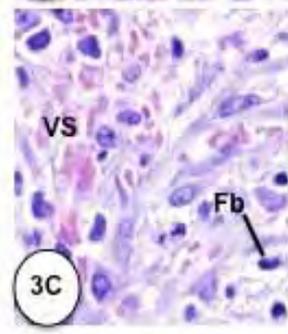
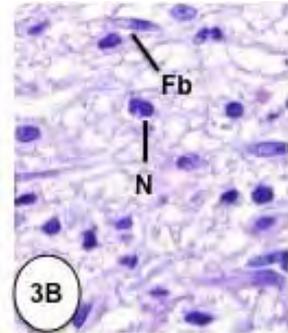
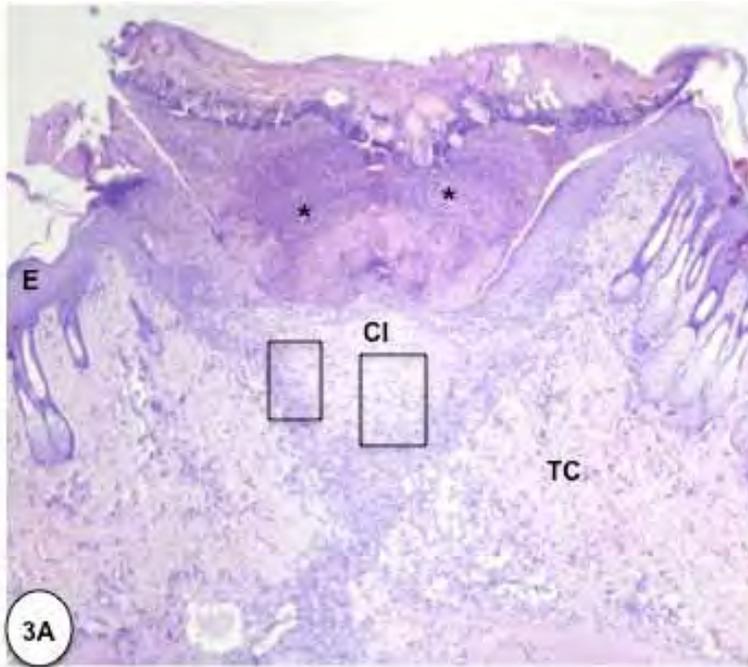
FIGURA 1 – Fotomicrografia de uma porção da pele incisada com bisturi, no dia do sacrifício, revela uma incisão bem definida atingindo a derme, envolvendo epitélio (E) e tecido conjuntivo (TC). 175x. HE.

FIGURAS 2A e 2B – Fotomicrografias de uma porção da pele após a incisão com laser, no dia do sacrifício. A **figura 2A** mostra que a incisão atingiu a derme profunda (Dp) caracterizada pela presença de feixes espessos de fibras colágenas (Fc). 175x. HE. A **figura 2B**, região delimitada na figura 2A, mostra que a superfície da incisão é revestida por uma camada de material amorfo fortemente basófilo (asteriscos). TC, tecido conjuntivo. 525x. HE.

- **Período I: 3 dias**

BISTURI: Observa-se um extenso infiltrado inflamatório na derme com presença de neutrófilos na área subjacente à ferida; a proliferação de fibroblastos e vasos sanguíneos também foi observada (Figuras 3A, 3B e 3C).

LASER: Presença de grande infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo, se estendendo até a camada de tecido muscular. No infiltrado observa-se muitos macrófagos e neutrófilos. Neste período o tecido epitelial já reveste a porção incisada da derme. (Figuras 4A e 4B).



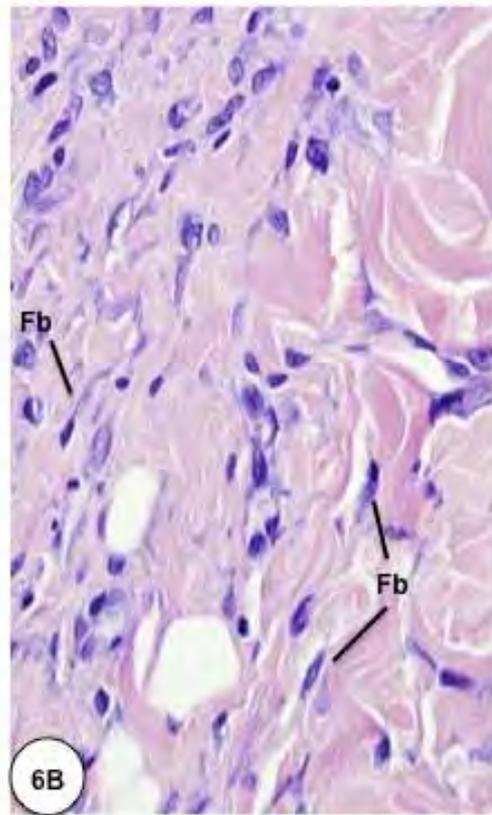
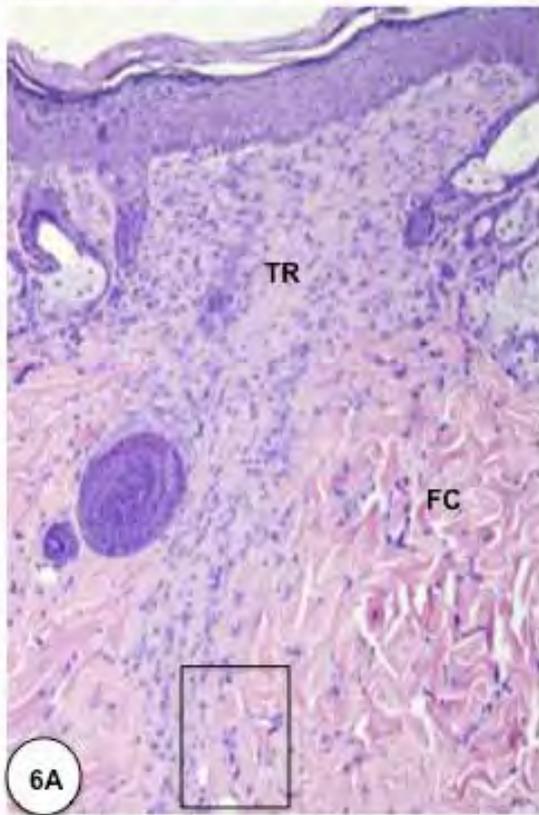
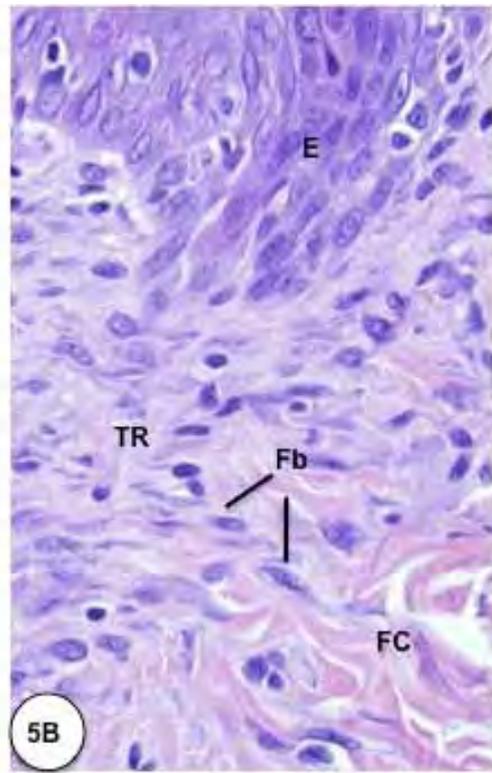
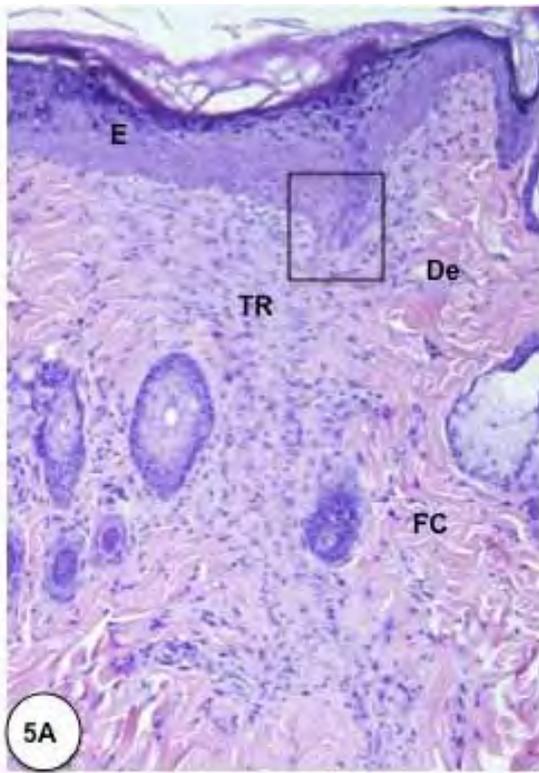
FIGURAS 3A-3C – Fotomicrografias mostrando uma porção da pele após 3 dias à incisão com bisturi. **Figura 3A** - O tecido epitelial (E) reveste as porções laterais da incisão que se apresenta recoberta por material acidófilo de aspecto amorfo (asteriscos); subjacente ao material acidófilo, observa-se um acúmulo de células inflamatórias, predominantemente neutrófilos (CI). 70x. HE. **Figura 3B** - A região da incisão na derme profunda, área delimitada na figura 3A, exibe alguns neutrófilos (N) e fibroblastos (Fb) envolvidos por uma matriz extracelular constituída por escassa rede fibrilar. 525x. HE. A **figura 3C**, área entre a região central da incisão e o tecido conjuntivo da derme, com aspecto aparentemente não alterado (área demarcada em 3A), mostra fibroblastos (Fb) e inúmeros vasos sanguíneos (VS). 525x. HE.

FIGURAS 4A e 4B – Fotomicrografias mostrando uma porção da pele após 3 dias da incisão com laser. A **Figura 4A** mostra, na região de incisão, um infiltrado inflamatório (CI) na derme que se estende até a camada muscular (CM). Note que neste corte histológico, a epiderme (E) constitui uma camada contínua de células epiteliais. TC, tecido conjuntivo. 70x. HE. A **figura 4B**, área demarcada na figura 4A, mostra diversos neutrófilos (N) e alguns monócitos (M) na derme. 1710x. HE.

- **Período II: 7 dias**

BISUTRI: O tecido continua em reparo, com grande proliferação celular, predominantemente fibroblastos. No entanto, observa-se ainda muitas células inflamatórias presentes, principalmente ao redor do tecido muscular. O tecido epitelial já apresenta continuidade neste período. Ainda não é possível observar feixes de fibras colágenas totalmente organizados (Figuras 5A e 5B).

LASER: Em meio ao infiltrado inflamatório, nota-se a presença fibroblastos no tecido conjuntivo em reparação. O epitélio apresenta continuidade (Figuras 6A e 6B).



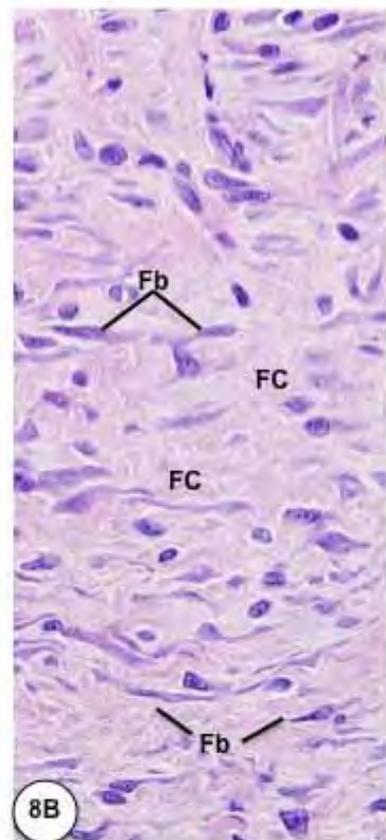
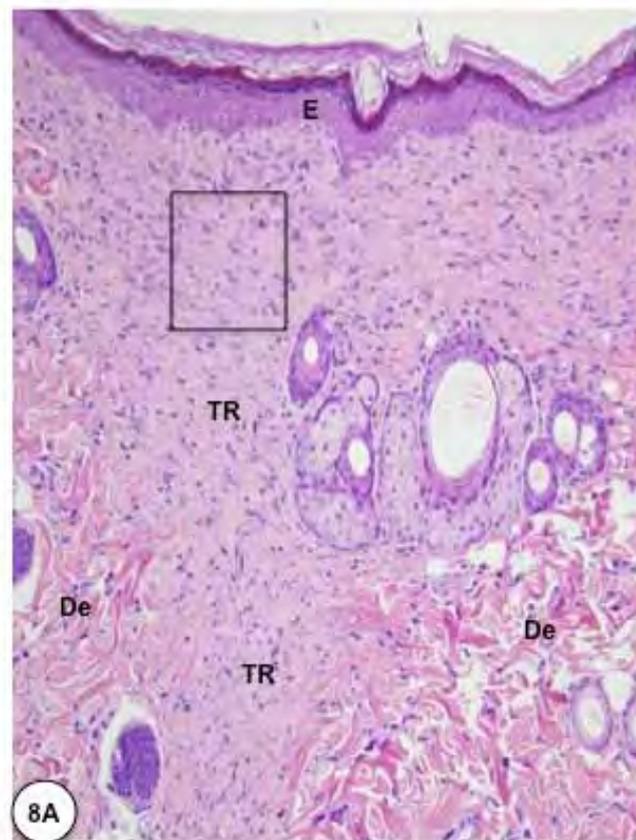
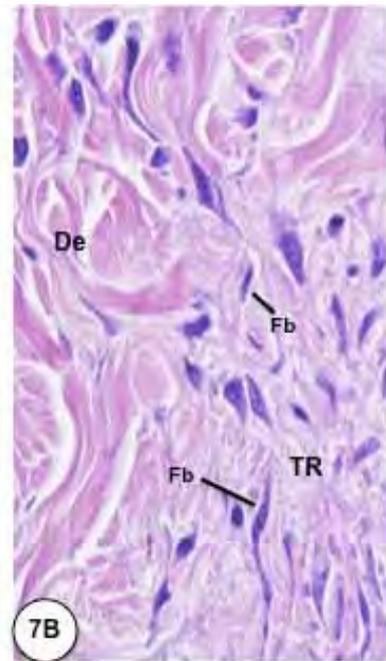
FIGURAS 5A e 5B – Fotomicrografias mostrando uma porção da pele após 7 dias à incisão com bisturi. A **figura 5A** mostra que a epiderme forma uma camada contínua (E); o tecido conjuntivo (TR) na região incisada exhibe alta densidade celular quando comparado à derme adjacente (De) a qual exhibe, predominantemente, feixes de fibras colágenas (FC). 175x. HE. A **figura 5B**, área demarcada na figura 5A, o tecido conjuntivo em regeneração (TR) contendo diversos fibroblastos (Fb) entre as fibras colágenas (FC). E, epitélio. 525x. HE.

FIGURAS 6A e 6B – Fotomicrografias mostrando uma porção da pele após 7 dias da incisão com laser. A **Figura 6A** mostra, na região de incisão, a camada de epiderme contínua (E) revestindo o tecido conjuntivo em regeneração (TR). Este mesmo tecido, contendo alta densidade celular, estende-se à camada profunda da derme. Note que o tecido conjuntivo da derme adjacente à incisão apresenta feixes espessos de fibras colágenas (FC). 175x. HE. A **figura 6B**, área demarcada na figura 6A, mostra o tecido conjuntivo em regeneração exibindo inúmeros fibroblastos (Fb). 525x. HE.

- **Período III: 15 dias**

BISTURI: As imagens revelam feixes de fibras colágenas mais evidentes, estando mais delgadas em relação ao tecido da derme. No tecido conjuntivo em reparação, observa-se muitos fibroblastos (Figuras 7A e 7B).

LASER: Predominam fibroblastos, com fibras colágenas delgadas mais evidentes que aos 7 dias, sendo as imagens muito semelhantes ao tratamento com bisturi neste mesmo período (Figuras 8A e 8B).



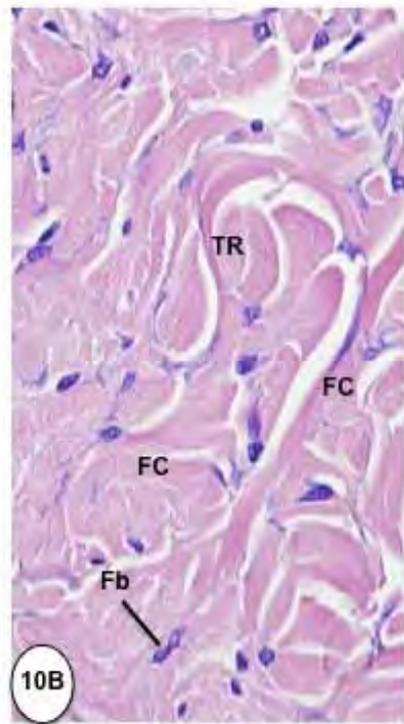
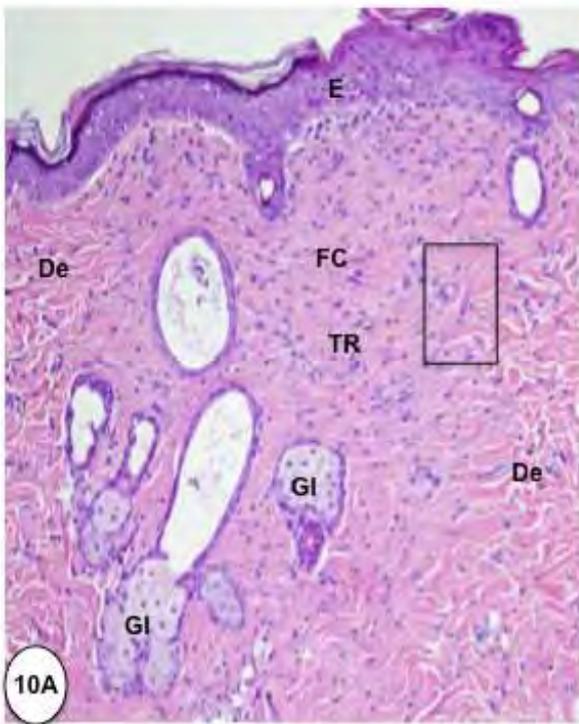
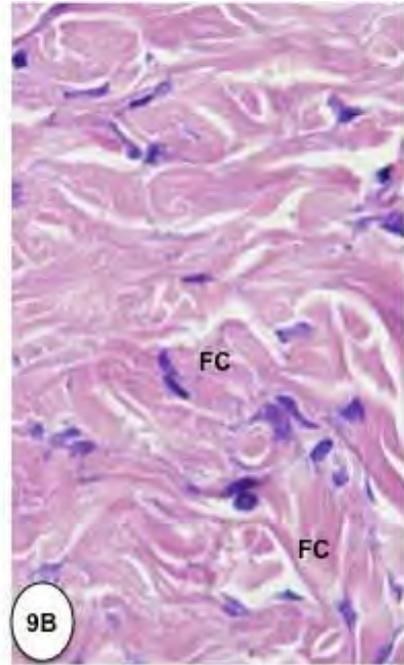
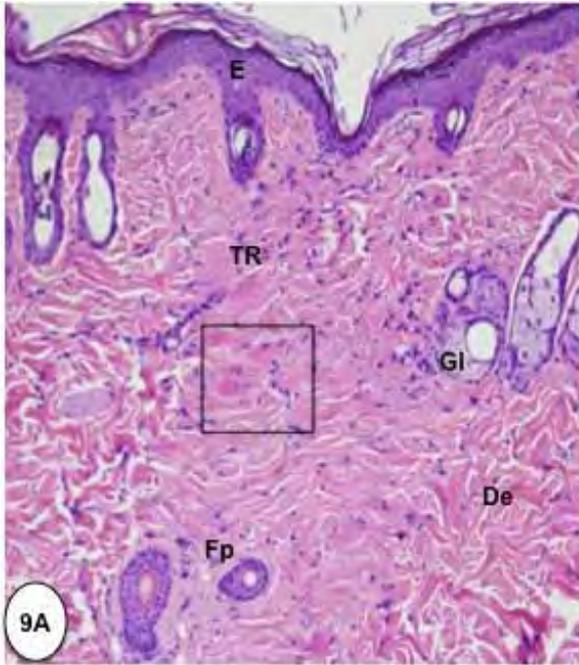
FIGURAS 7A e 7B – Fotomicrografias mostrando uma porção da pele após 15 dias à incisão com bisturi. **Figura 7A** - O tecido epitelial (E) reveste continuamente a área incisada; inúmeros fibroblastos (Fb) são observados no tecido conjuntivo (TR) em regeneração. Note que, nesta região, a maioria dos fibroblastos (Fb) apresentam seu eixo maior paralelo à superfície do epitélio (E). O tecido conjuntivo adjacente (De) exhibe aspectos morfológicos típicos da derme, feixes espessos de fibras colágenas (FC) entre os fibroblastos (Fb). Fp, folículo piloso. 175x. HE. A **figura 7B**, área demarcada da figura 7A, mostra feixes delgados de fibras colágenas entre os fibroblastos (Fb) do tecido conjuntivo em regeneração (TR). De, derme. 525x. HE.

FIGURAS 8A e 8B – Fotomicrografias mostrando uma porção da pele após 15 dias à incisão com laser. **Figura 8A** - A área incisada apresenta-se revestida por tecido epitelial por toda extensão (E). O tecido conjuntivo na região incisada exhibe sinais de reparação (TR): contém inúmeros fibroblastos entre as fibras colágenas. Note que a derme (De) adjacente exhibe uma aparente diferença na espessura dos feixes de colágeno e na quantidade de células. 175x. HE. A **figura 8B**, área demarcada na figura 8A, evidencia fibroblastos amplos (Fb) exibindo núcleo com cromatina frouxa entre as fibras colágenas (FC) em formação. 525x. HE.

- **Período IV: 30 dias**

BISTURI: As imagens obtidas mostram feixes de fibras colágenas mais organizadas, sendo menor a visualização de células inflamatórias. Sentido do tecido cicatricial (mais profundo) perpendicular à superfície externa da derme. Observa-se, ainda, tecido conjuntivo denso, com feixes bem definidos e espessos (Figuras 9A e 9B).

LASER: Observa-se os mesmos eventos encontrados no tratamento com bisturi. O tecido conjuntivo em reparação apresenta feixes de fibras colágenas mais espessas; no entanto, o músculo ainda se encontra em descontinuidade (Figuras 10A e 10B).



FIGURAS 9A e 9B – Fotomicrografias mostrando uma porção da pele após 30 dias à incisão com bisturi. A **figura 9A**, visão geral da região em reparação da pele incisada, mostra a camada contínua do epitélio regenerado (E) revestindo a derme constituída por um tecido conjuntivo denso (TR). Observe que ainda há uma aparente diferença na organização estrutural do tecido conjuntivo em reparação em comparação à derme adjacente (De). Fp, folículos pilosos; Gl, glândulas sebáceas. 175x. HE. A **figura 9B**, área demarcada na 9A, mostra fibrócitos com escasso citoplasma e núcleo fortemente basófilo entre os feixes espessos de fibras colágenas (FC). 525x. HE.

FIGURAS 10A e 10B – Fotomicrografias mostrando uma porção da pele após 30 dias à incisão com laser. A **figura 10A** mostra o epitélio regenerado (E) e o tecido conjuntivo (TR) exhibe diversas células alongadas entre os feixes de colágeno (FC). Note que a organização estrutural do tecido em reparação (TR) ainda apresenta diferenças em relação à da derme adjacente (De). Porções de glândulas (Gl) estão presentes nesta região da derme em reparação (TR). 175x. HE. A **figura 10B**, área demarcada da 10A, mostra uma porção do tecido conjuntivo em reparação (TR) com feixes espessos de colágeno (FC) e fibroblastos (Fb). 525x. HE.

4. ESTUDO II

4.1 – Material e métodos

COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi primeiramente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, dentro dos regulamentos exigidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sob nº CEEA 11/2008 (Anexo 1).

Avaliação histológica da utilização do laser de

Er,Cr:YSGG em tecido ósseo

AMOSTRA

Neste estudo foram utilizados os mesmos 20 animais do estudo I e os procedimentos do estudo II realizados na mesma sessão cirúrgica dos procedimentos realizados no estudo I.

PROCEDIMENTOS PRÉ OPERATÓRIOS

Os animais foram anestesiados por associação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 0,08 ml/100g de massa corporal (Cloridrato de Quetamina – Francotar – Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.) e 0,04 ml/100g de massa corporal (Cloridrato de Xilazina - Virbaxyl 2% - Virbac do Brasil Ind. E Com. Ltda.), respectivamente.

Os animais foram submetidos à tricotomia da região da calota craniana e realizada anti-sepsia do campo cirúrgico com gaze estéril, embebida em solução de clorexidina 2%, com o animal posicionado em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica (Figura 6).



FIGURA 6 - Calota craniana tricotomizada.

O acesso cirúrgico à calota craniana foi obtido com uma incisão ântero-posterior cutânea e muscular, realizada com bisturi de lâmina nº 15 (Feather Safety Razor Co, Ltda – Japão), permitindo a exposição do periósteo (Figura 7).



FIGURA 7 - Acesso cirúrgico à calota craniana por meio de incisão ântero-posterior.

Em seguida, os tecidos foram divulsionados com o auxílio de uma tesoura pequena de extremidade romba e uma pinça de dissecação, até a exposição do

periósteo, sendo este incisado e removido com lâmina de bisturi nº 15 (Feather Safety Razor Co, Ltda – Japão) até a exposição do tecido ósseo (Figura 8).



FIGURA 8 - Exposição do tecido ósseo da calota.

ESPECIFICAÇÕES DO LASER

O laser de Er,Cr:YSGG (*Erbium-Cromium: Ytrium, Scandium, Gallium, Garnet*) – Waterlase, Biolase, USA (Figura 5) – utilizado durante os procedimentos apresenta as seguintes características: 2,78 μ m de comprimento de onda, 20 Hz de frequência, energia de pulso variando entre 0 e 300mJ, potência média ajustável variável entre 0.0 e 6.0 W e emissão pulsada com duração de 140-150 μ s (manual Waterlase). O diâmetro da ponta utilizada neste estudo é de 600 μ m e 6mm de comprimento. Os parâmetros utilizados foram: 150mJ de energia de pulso e 3.0W de potência, com 50% de emissão de água e ar. A ponta do laser foi mantida perpendicular à região e sem contato com o tecido.

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Em cada rato foram realizadas randomicamente dois defeitos ósseos contralaterais na calota (lado direito e esquerdo), sendo uma realizada com fresa esférica diamantada número 1012 (KG Sorensen – Agerskov, Dinamarca) acoplada a um micromotor em baixa rotação (Driller – São Paulo, Brasil) sob irrigação constante com solução de soro fisiológico. O outro defeito era confeccionado com laser de Er,Cr:YSGG nos parâmetros acima mencionados.

Os defeitos foram realizados com 5mm de comprimento e durante a confecção dos defeitos, tomava-se o cuidado de não perfurar a dura-máter, tendo esta membrana como limite de corte/penetração e preservando-a intacta.

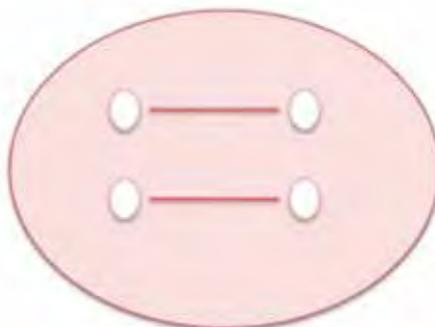
No total, foram confeccionados cirurgicamente 40 defeitos, distribuídos randomicamente da seguinte maneira:

Tabela 2 - Grupos experimentais do Estudo II

	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias	Total de defeitos
Fresa	5	5	5	5	20
Laser Er,Cr:YSGG	5	5	5	5	20
Total de defeitos	10	10	10	10	40

A região que compreendeu os defeitos foi delimitada através de marcações realizadas utilizando-se fresa diamantada esférica nº 1012 (KG Sorensen – Agerskov, Dinamarca) sendo que estas marcações foram preenchidas com guta

percha para posterior definição das áreas no momento da colheita do material histológico. Estas marcações foram localizadas a uma distância de 2mm acima do limite superior do defeito e outra 2 mm abaixo do limite inferior do defeito, de acordo com o esquema 2 e a figura 9:



Esquema 2. Imagem ilustrativa do modo de realização dos defeitos ósseos na calota com fresa diamantada e laser Er,Cr:YSGG assim como a marcação com guta percha.



FIGURA 9 - Delimitações realizadas com guta percha na calota para posterior remoção da peça histológica. Laser Er,Cr:YSGG (incisão superior) e fresa diamantada (incisão inferior).

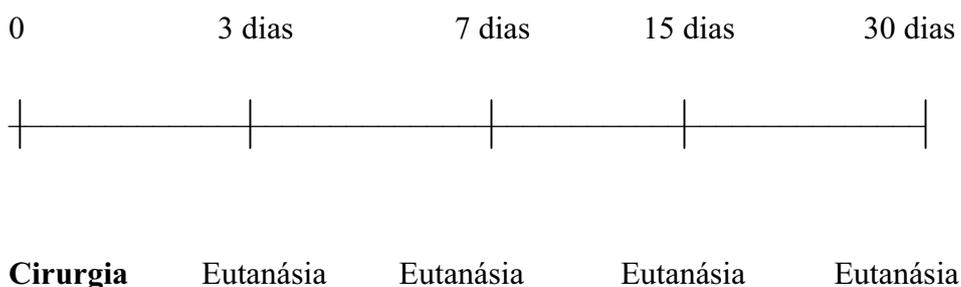
Após a criação dos defeitos, realizou-se sutura simples com fio de seda 4.0 (TechNew, Brasil) envolvendo perióstio e demais tecidos moles da calota craniana, de maneira que oclusse toda a ferida.

MEDICAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

Após a intervenção cirúrgica foi administrado analgésico (Paracetamol – Medley, Brasil) na concentração de 50mg/100g de peso corpóreo do animal, por via de gavagem, em dose única.

DESENHO EXPERIMENTAL

Cada grupo (fresa ou laser) foi avaliado em 4 períodos experimentais (3, 7, 15 e 30 dias), sendo os mesmo 20 animais do estudo I, de acordo com o seguinte desenho experimental:



OBTENÇÃO DAS PEÇAS CIRÚRGICAS

Após os períodos correspondentes aos 3, 7, 15 e 30 dias de pós-operatório, os animais foram sacrificados com sobredose anestésica.

Após a remoção dos tecidos do dorso referente os estudo I, removeu-se a cabeça dos animais através de técnica cirúrgica adequada utilizando tesouras e alicate de corte. A partir deste momento, as peças foram fixadas em formol a 10%, por um período de 24 horas e, em seguida, descalcificadas em EDTA por um período de 60 dias, com três trocas semanais. Depois deste período, o material foi reduzido até o tamanho dos defeitos com sua margem de segurança, removendo neste momento, a área delimitada pela guta percha. Assim, cada biópsia foi dividida em dois blocos, tendo como referência a linha mediana da calota do animal. Cada novo bloco foi então identificado de acordo com o período experimental e o procedimento realizado. Após este período, o material foi neutralizado em água corrente por 24h e, em seguida, desidratados numa seqüência de soluções alcoólicas em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e absoluto), diafanizados em xilol por 3 horas e finalmente infiltrados por 18 horas e incluídos em parafina, de acordo com a metodologia de rotina empregada no laboratório de Histologia da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

O material processado foi cortado em micrótomo com cortes semi-seriados de 6µm de espessura, divididos em lâminas com 5 cortes cada, totalizando 30 cortes por bloco. O plano de secção dos cortes foi transversal em relação aos defeitos ósseos. As lâminas foram desparafinizadas e rehidratadas para coloração pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) para análise morfológica.

ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA DOS DEFEITOS ÓSSEOS

A avaliação histológica foi feita utilizando-se um microscópio de luz DIASTAR (Leica Reichert & Jung Products, Alemanha), com objetivas para aumento de 4 a 100 vezes e oculares com aumento de 10 vezes, através da qual as imagens foram observadas e avaliadas. As imagens representativas feitas foram enviadas para um microcomputador através de uma câmera fotográfica digital DFC-300-FX (Leica Microsystems, Alemanha), com resolução de 1.3 megapixels, acoplada ao microscópio óptico, para sua posterior utilização na descrição dos resultados obtidos. Assim, foram avaliados processos de destruição e reparação de tecido ósseo.

As seguintes características foram analisadas:

- contorno geral do defeito criado, assim como suas bordas e delimitações;
- alterações na matriz orgânica do tecido ósseo;
- regiões de necrose;
- mudanças na morfologia de células dos espaços medulares subjacentes ao sítio de tratamento ;
- presença ou ausência de resposta tecidual, observando possível regeneração óssea, presença de células gigantes, osteoclastos, osteoblastos e células características de processo inflamatório.

Todas as análises foram feitas através de um único examinador treinado e cego para os grupos.

Análise histométrica dos defeitos ósseos

Para a avaliação histométrica, foram avaliados a área total e a área do defeito ósseo em cada grupo experimental (fresa ou laser de Er,Cr:YSGG) nos diferentes períodos.

As avaliações foram realizadas por um único examinador treinado e cego para os grupos experimentais e as mensurações foram feitas em triplicata, ou seja, o operador realizou as mensurações em três momentos distintos, com intervalo de uma semana entre cada avaliação. Para cada grupo nos diferentes períodos foram selecionadas 3 lâminas. As mensurações foram realizadas com os mesmos equipamentos da análise histológica. A determinação dos valores foi feita utilizando um software analisador de imagens Image J (Sigma ProScan, Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA).

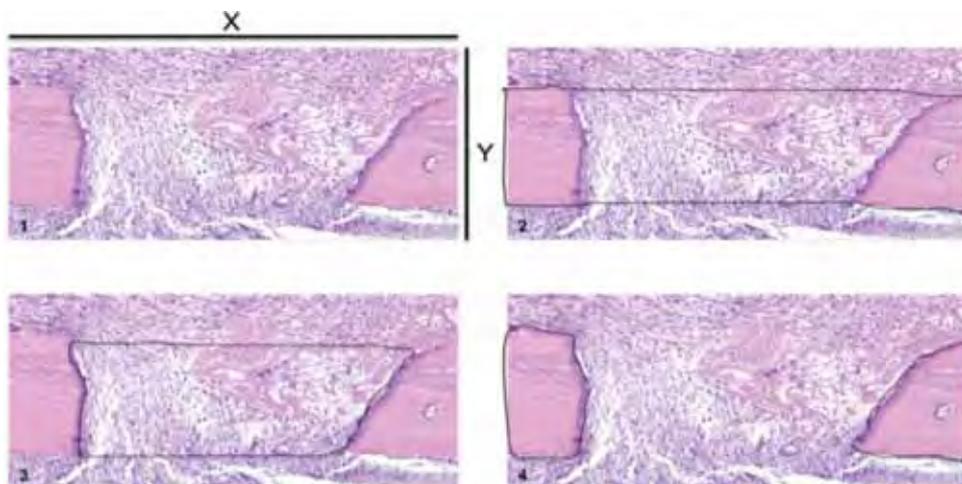
As mensurações foram feitas seguindo o protocolo do esquema 3:

1) as imagens selecionadas eram padronizadas no tamanho que compreendia uma área com 3400mm de largura por 2000mm de altura (figura 1), de tal maneira que o centro do defeito ocupasse a região central da imagem;

2) a área total era obtida através da medida da imagem que compreendia tecido ósseo e defeito (figura 2);

3) a área do defeito ósseo (figura 3);

4) a diferença entre a área total e a área do defeito ósseo resultava na área de tecido ósseo presente (figura 4). Este valor era então calculado em relação à área total e transformado em porcentagem.



Esquema 3. Modo de realização das mensurações para análise histométrica.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a verificação da distribuição normal dos dados, escolheu-se o teste paramétrico ANOVA, para analisar a existência de diferenças estatísticas entre os grupos, complementado com o teste de Bonferroni para avaliar onde as diferenças se encontravam. Os testes foram aplicados com 95% de intervalo de confiança. Toda a análise foi realizada pelo software GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA).

4.2 – Resultados

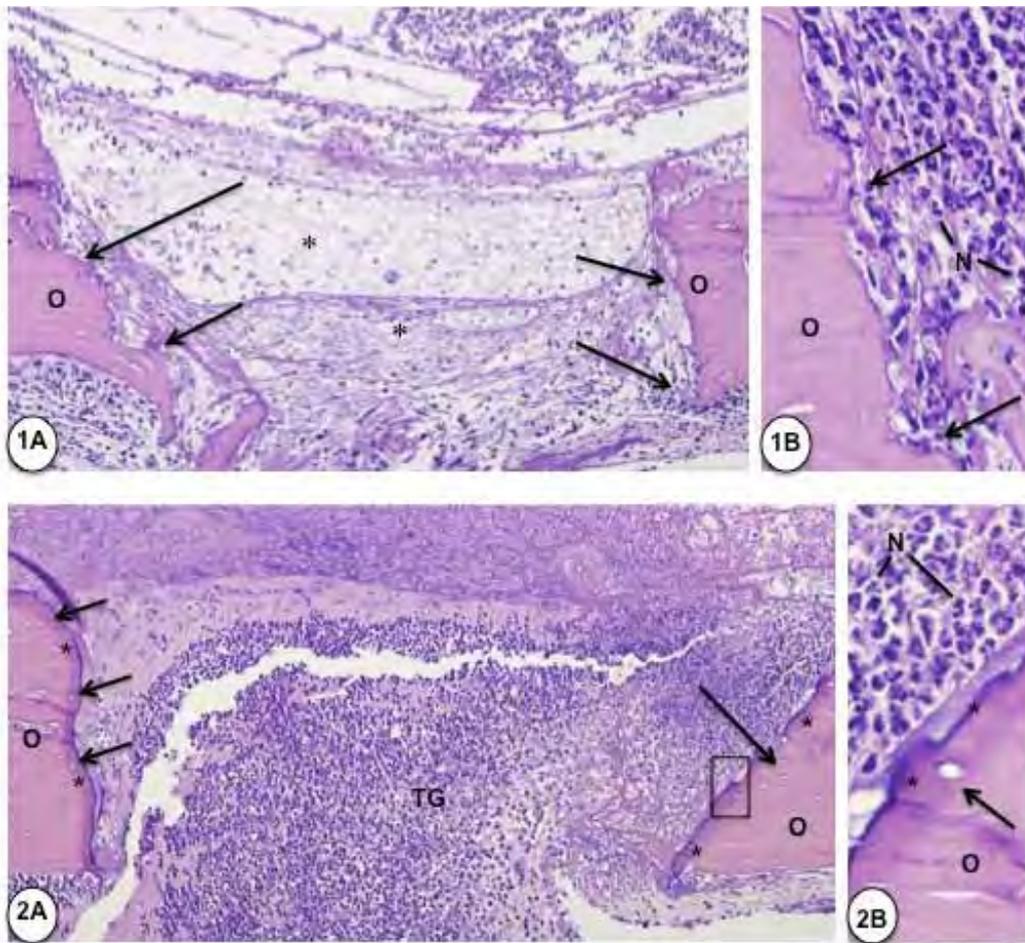
Avaliação histológica da utilização do laser de Er,Cr:YSGG em tecido ósseo

Da mesma forma que no Estudo I, os resultados serão apresentados de acordo com o período experimental, abrangendo tanto as respostas dos procedimentos com fresa quanto as respostas dos procedimentos com o laser de Er,Cr:YSGG. Desta forma, fica visualmente mais fácil avaliar as modificações dos tecidos diante dos dois tratamentos distintos.

- **Período I: 3 dias**

FRESA: Presença de remanescentes do coágulo em meio a um infiltrado inflamatório intenso onde predominam neutrófilos, evidenciando a fase inicial de inflamação (Figuras 1A e 1B).

LASER: Tecido de granulação preenche a cavidade óssea criada, com presença marcante de neutrófilos e restos de coágulo ao redor do defeito. Linha basófila evidencia a necrose superficial do tecido ósseo. As lacunas dos osteócitos encontram-se vazias, mostrando que o osso superficial está necrosado. Algumas cavidades ósseas, adjacentes às áreas de corte, encontram-se preenchidas por infiltrado inflamatório, predominando neutrófilos (figuras 2A e 2B).



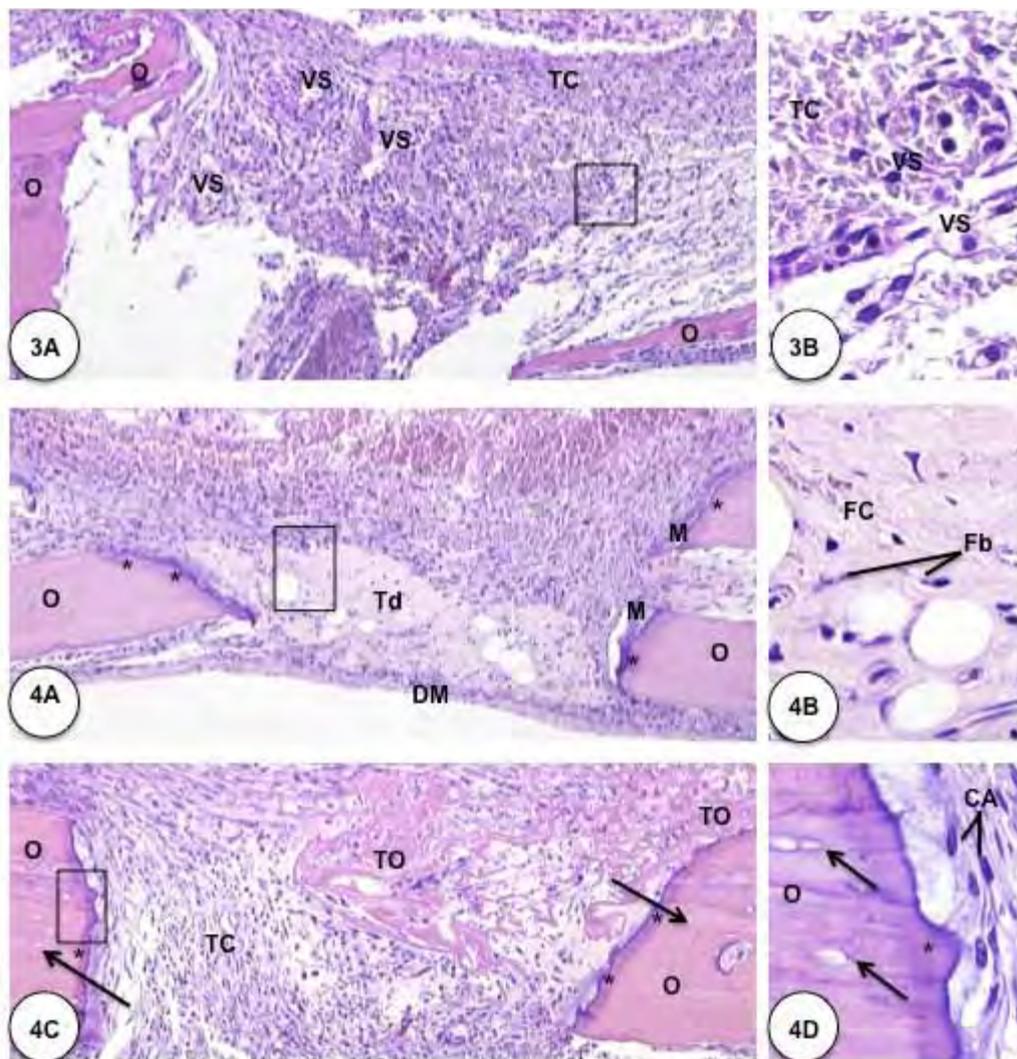
FIGURAS 1A e 1B – Fotomicrografias mostrando regiões da calota craniana após 3 dias à realização da cavidade com a fresa. A **figura 1A** mostra a cavidade óssea contendo remanescentes do coágulo sanguíneo (asteriscos); a superfície óssea apresenta-se irregular (setas). O, osso da calota craniana. 175x. HE. A **figura 1B** mostra, em maior aumento, parte de uma cavidade contendo inúmeras células inflamatórias, predominantemente, neutrófilos (N) adjacentes à superfície irregular da parede óssea (setas) . O, osso da calota craniana. 525x. HE.

FIGURAS 2A e 2B – Fotomicrografias mostrando região da calota craniana após 3 dias da confecção da cavidade com o laser. **Figura 2A** - Um tecido de granulação (TG) contendo numerosas células inflamatórias preenche a cavidade óssea. Note que a superfície das paredes laterais da cavidade óssea apresenta-se fortemente basófila, característico de carbonização superficial (asteriscos); a porção óssea da calota craniana (O), próximo à cavidade, exhibe as diversas lacunas vazias (setas). 175x. HE. **Figura 2B** – área demarcada na figura 2A mostra a intensa quantidade de neutrófilos (N) no interior da cavidade óssea e a superfície da parede óssea fortemente basófila (asteriscos); uma lacuna de osteócito vazia (seta) também é observada no osso da calota craniana (O). 525x. HE.

- **Período II: 7 dias**

FRESA: Observa-se tecido de granulação sendo substituído por uma proliferação de fibroblastos e vasos sanguíneos, persistindo ainda algumas células inflamatórias. O osso apresenta sinais de remodelação com presença de numerosos osteoclastos (Figuras 3A e 3B).

LASER: Proliferam fibroblastos em meio ao remanescente do coágulo, com presença de hialinização (tecido conjuntivo necrosado). A superfície do defeito ainda se apresenta irregular e basófila, resultado da necrose superficial. As lacunas dos osteócitos vazias estão mais evidentes. Em algumas imagens, observamos a formação de tecido conjuntivo denso, no centro da cavidade (Figuras 4A a 4D).



FIGURAS 3A e 3B – Fotomicrografias mostrando a região da calota craniana após 7 dias da realização da cavidade com a fresa. Na **figura 3A**, a cavidade óssea apresenta-se preenchida por tecido conjuntivo (TC) contendo fibroblastos, células inflamatórias e diversos vasos sanguíneos (VS). A superfície óssea das paredes da cavidade apresenta-se irregular. O, osso da calota craniana. 175x. HE. A **figura 3B**, área demarcada em 3A, evidencia algumas células inflamatórias e vasos sanguíneos (VS). TC, tecido conjuntivo. 525x. HE.

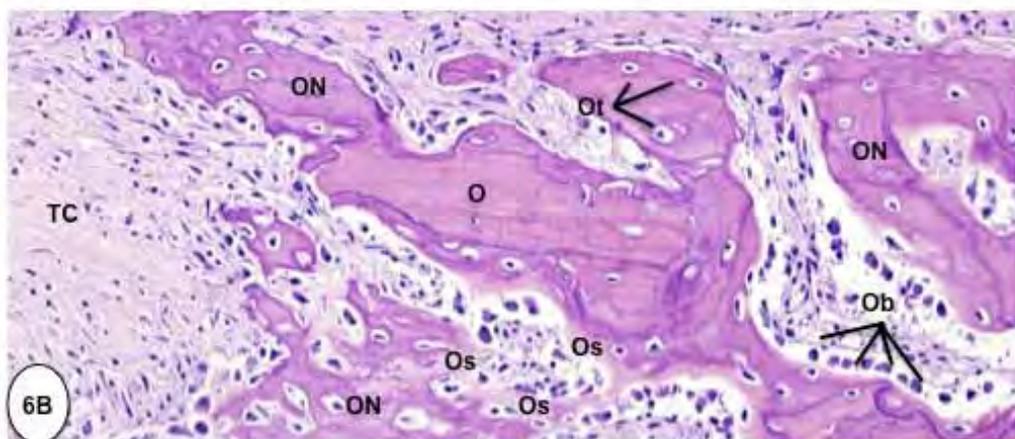
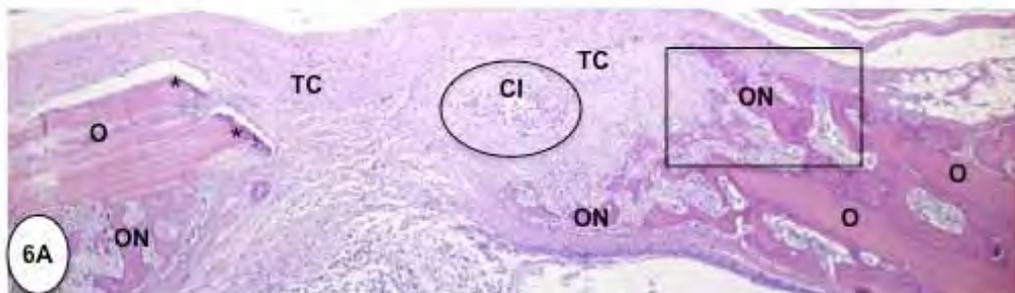
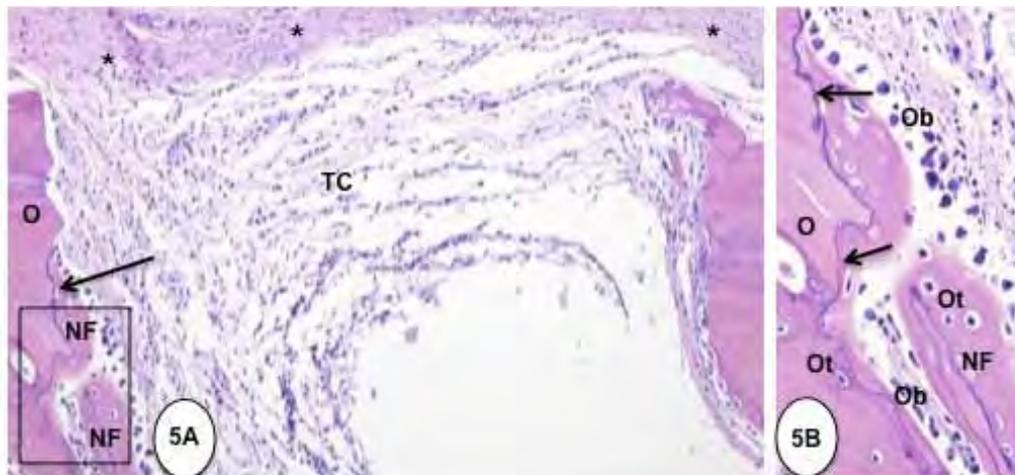
FIGURAS 4A-4D – Fotomicrografias mostrando regiões da calota craniana após 7 dias da realização da cavidade com laser. Na **figura 4A**, a cavidade óssea está quase totalmente preenchida por tecido conjuntivo denso (Td); note que a dura-máter (DM), membrana de tecido conjuntivo denso, apresenta-se contínua. A superfície óssea irregular das paredes da cavidade apresenta-se fortemente basófila (asteriscos); em algumas regiões, um material basófilo de aspecto amorfo (M) está justaposto à superfície das paredes óssea (O). Carbonização superficial (asteriscos). 175x. HE. A **figura 4B**, área demarcada em 4A, mostra fibroblastos (Fb) rodeados por uma matriz rica em fibras colágenas (FC). 525x. HE. A **figura 4C** revela que um material irregular e acidófilo (TO), justaposto à parede óssea, que projeta-se ao centro da cavidade exibindo algumas células no interior de lacunas, similar a trabéculas ósseas. Tecido conjuntivo (TC); lacunas ósseas vazias (setas); O, osso da calota craniana. 175x. HE. A **figura 4D**, área demarcada em 4C, mostra células alongadas (CA). Lacunas ósseas vazias (setas). O, osso da

calota craniana; Carbonização superficial (asteriscos). 525x. HE.

- **Período III: 15 dias**

FRESA: Tecido de granulação praticamente substituído por fibroblastos e tecido conjuntivo frouxo. Presença de neoformação óssea na cortical óssea e também nas proximidades do defeito criado. Neste período, observa-se os primeiros sinais de formação óssea com tecido ósseo primário no tratamento realizado com fresa (Figuras 5A e 5B).

LASER: Apesar de todas as imagens ainda apresentarem necrose superficial, observa-se osso primário dentro de cavidades e colados ao osso. O tecido conjuntivo se apresenta bem organizado, rico em feixes de fibras colágenas. Na loja óssea encontram-se algumas células inflamatórias em meio ao tecido de granulação. Em alguns casos, observou-se que havia formação óssea no sentido de fechar a cavidade na porção interna do defeito, além de tecido ósseo se formando na porção inferior do osso parietal (Figuras 6A e 6B).



FIGURAS 5A e 5B – Fotomicrografias mostrando a região da calota craniana após 15 dias da realização da cavidade com a fresa. **Figura 5A** - A cavidade óssea apresenta-se preenchida por tecido conjuntivo frouxo (TC) com fibroblastos e escassas fibras colágenas. Uma camada de osso neoformado (NF) contendo diversos osteócitos está justaposta ao osso (O); note a linha basófila de reversão (seta), entre o osso da parede da cavidade e o neoformado (NF), delimitando o osso pré-existente da calota craniana do osso neoformado. A porção externa da cavidade óssea é revestida por um tecido conjuntivo denso (asteriscos). 175x. HE. A **figura 5B**, área demarcada na figura 5A, mostra a camada “NF” contendo osteócitos (Ot) no interior de lacunas arredondadas aderida ao osso (O) da parede da cavidade. Uma camada de osteoblastos (Ob) reveste a superfície do osso “NF”. 345x. HE.

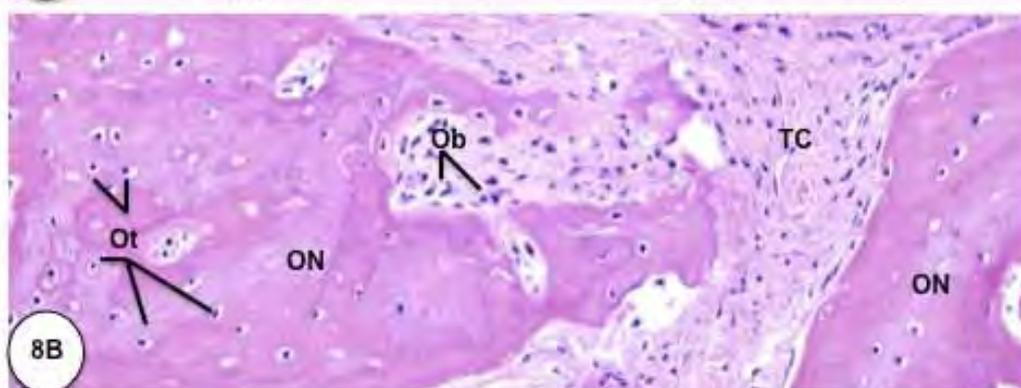
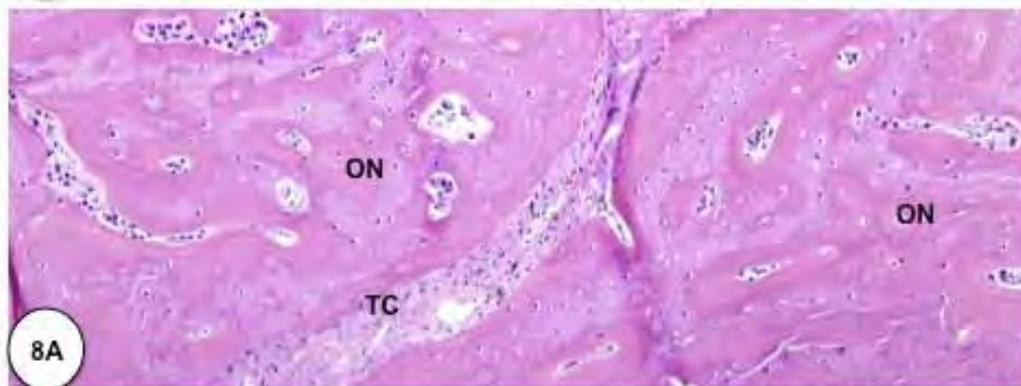
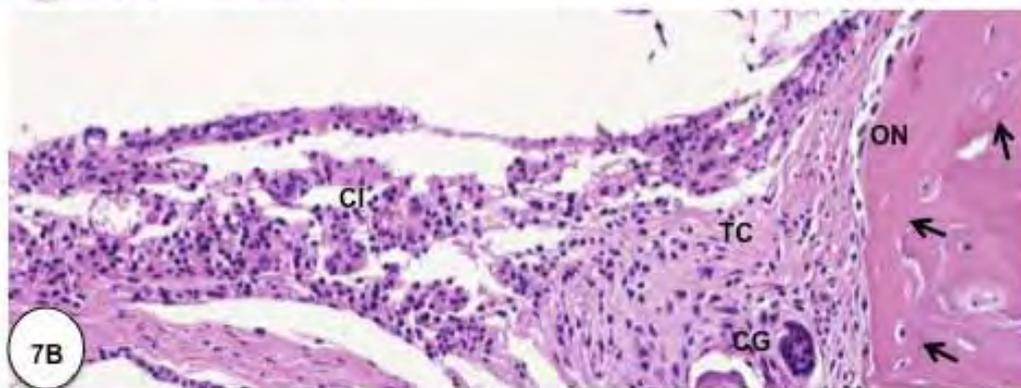
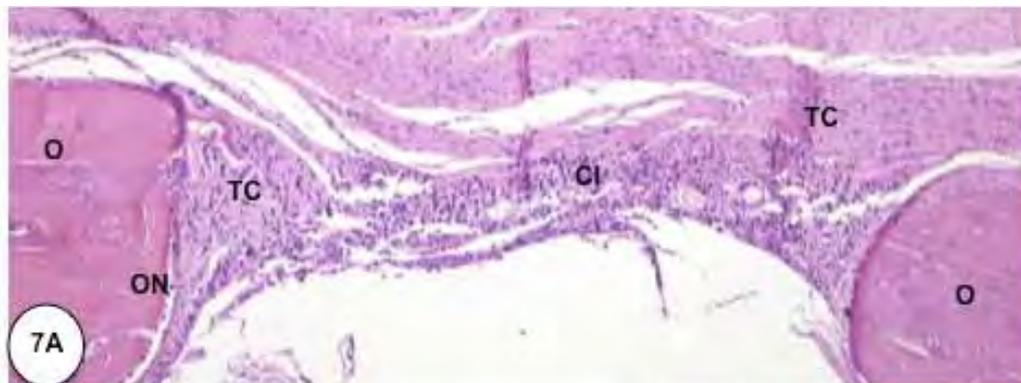
FIGURAS 6A e 6B – Fotomicrografias mostrando a região da calota craniana após 15 dias da realização da cavidade com o laser. Na **figura 6A** a cavidade óssea apresenta-se quase totalmente preenchida por tecido conjuntivo denso (TC), rico em fibras colágenas; células inflamatórias (CI) estão aglomeradas numa região restrita da cavidade. Delgadas trabéculas ósseas (ON) aderidas à parede do osso (O) estendem-se ao interior da cavidade. Na outra extremidade, a superfície óssea ainda apresenta aspecto de carbonização (asteriscos); nesta extremidade, a neoformação óssea está restrita a porção interna da calota. 70x. HE. A **figura 6B**, área demarcada da figura 6A, revela parte do osso neoformado (ON) exibindo

diversos osteócitos (Ot). Osteoblastos (Ob); camada osteóide (Os). 345x. HE.

- **Período IV: 30 dias**

FRESA: Observa-se a presença de tecido inflamatório no centro da cavidade do defeito ainda persistindo células inflamatórias, com visualização de células gigantes, linfócitos e monócitos. A neoformação óssea é mais pobre e restrita do que no tratamento com laser, no mesmo período (Figuras 7A e 7B).

LASER: Na camada interna do defeito nota-se a presença de osso neoformado, apresentando-se mais denso e com menos sinais de osso primário do que no período de 15 dias. A necrose superficial no defeito se apresenta menos evidente. Em algumas imagens observou-se acentuada neoformação óssea a partir das paredes laterais do defeito ósseo em direção ao centro, preenchendo quase toda a cavidade óssea (Figuras 8A e 8B).



FIGURAS 7A e 7B – Fotomicrografias mostrando regiões da calota craniana após 30 dias da realização da cavidade com a fresa. Na **figura 7A**, a cavidade óssea apresenta-se preenchida por tecido conjuntivo (TC) contendo inúmeras células inflamatórias (CI). Uma delgada camada de osso neoformado (ON) reveste a parede óssea (O) da cavidade. 175x. HE. A **figura 7B** mostra as diversas células inflamatórias, predominantemente linfócitos e monócitos, no tecido conjuntivo que preenche o defeito ósseo. Observe que o osso neoformado (ON) está restrito a uma delgada camada revestindo a superfície irregular da parede óssea (setas). CG, célula gigante multinucleada. 345x. HE.

FIGURAS 8A e 8B – Fotomicrografias mostrando regiões da calota craniana após 30 dias à realização da cavidade com o laser. As **figuras A e B** mostram o defeito ósseo na calota craniana quase que totalmente preenchido por tecido ósseo neoformado (ON). Note os inúmeros osteócitos (Ot) no interior de lacunas, típico de osso imaturo. O tecido conjuntivo denso (TC) preenche o centro do defeito ósseo. OB, osteoblastos. Figura A 196x e figura B 345x, HE.

Análise histométrica dos defeitos ósseos

A análise estatística dos dados histométricos (anexo 3) foi realizado pelo software Bioestat 3.0 (Bioestat Windows 1995 Sonopress; Manaus, Amazonas, Brasil).

Os dados foram avaliados em relação ao teorema do ponto central, para avaliar se a distribuição dos mesmos respeitava a distribuição normal. O resultado demonstrou que os dados das variáveis apresentaram distribuição normal. Desta forma o teste paramétrico ANOVA foi utilizado para analisar a existência de diferenças estatísticas entre os grupos, complementado com o teste de *Bonferroni* para avaliar onde a diferenças se encontram. Os testes foram aplicados com 95% de intervalo de confiança.

O teste ANOVA identificou uma diferença estatística entre os grupos ($p=0.0042$) e o teste de *Bonferroni* identificou que as diferenças ocorreram entre o grupo laser 30 dias com os grupos em que os defeitos foram executados com fresa (15 e 30 dias).

A estatística descritiva também foi executada com os seguintes resultados:

Tabela 3 – Comparação entre os tratamentos nos diferentes períodos:

(\pm DP, n= 5 defeitos por procedimento/período)

grupos	Porcentagem de osso			
	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
FRESA	61.98 \pm 5.40	63.29 \pm 5.72	62.05 \pm 4.84 [#]	58.23 \pm 9.99 ¹
LASER Er,Cr:YSGG	72.52 \pm 10.89	69.94 \pm 4.24	69.71 \pm 8.13	79.96 \pm 10.30 ^{#,1}

[#]Diferenças significantes quando comparado entre os grupos em períodos diferentes.

¹ Diferenças significantes quando comparado entre os grupos no mesmo período.

Teste de *Bonferroni*, $p < 0.05$

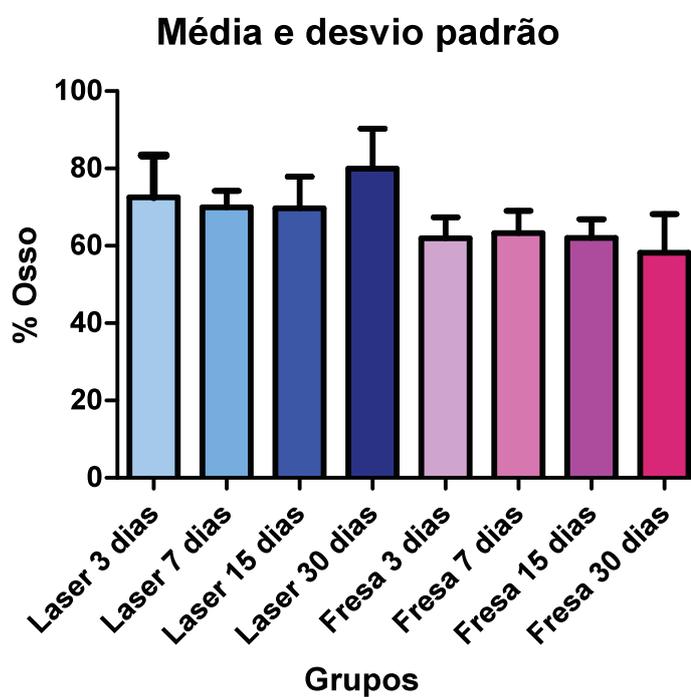


GRÁFICO 1 - Media e desvio padrão da fresa e laser nos 4 períodos.

5. Discussão

Os resultados obtidos demonstraram que, no dorso, no dia zero, as amostras irradiadas com laser de Er,Cr:YSGG apresentavam carbonização superficial em toda a derme, atingindo tecido epitelial e conjuntivo. No entanto, aos três dias, os sinais de necrose não foram mais evidentes, predominando neutrófilos e tecido amorfo em meio ao infiltrado inflamatório. Neste mesmo período, sinais de re-epitelização foram observados, sendo que aos 7 dias o tecido epitelial estava com sinais de diferenciação bastante avançados. Aos 15 e 30 dias, observou-se tecido conjuntivo com grande diferenciação celular, com presença de fibroblastos em meio ao tecido em maturação. As amostras utilizando bisturi, apresentavam limites de incisão bem definidos e nítidos no dia zero. Nos demais períodos, observou-se um processo regenerativo natural do epitélio e tecido conjuntivo. Deste forma, as incisões criadas com bisturi inicialmente mostraram maior resolução da inflamação. No entanto, aos 15 dias o processo inflamatório e regenerativo tanto das amostras com o laser quanto as com bisturi eram muito semelhantes.

No tecido mole ficou evidente que o processo de reparação tecidual com laser de Er,Cr:YSGG apresentou um atraso nos períodos iniciais de cicatrização, corroborando com os achados de outros trabalho com lasers cirúrgicos, como o de

Buchelt *et al*¹⁰, 1994; Arashiro *et al*⁵, 1996; McDavid *et al*⁴⁷, 2001 e Wang *et al*⁷⁶⁻⁷⁷, 2002, 2005 e D’Arcangelo *et al*¹³, 2006.

Nos primeiros dois períodos de avaliação observou-se no tecido ósseo amplo processo inflamatório no centro dos defeitos criados com a fresa e com o laser de Er,Cr:YSGG. No entanto, aos 7 dias já foi possível visualizar em algumas amostras irradiadas com laser tecido conjuntivo denso, ao passo que no tratamento com fresa a inflamação ainda persistia. Aos 15 dias os resultados demonstraram extensa formação óssea encontrada em todas as amostras do tratamento com laser, sendo que aos 30 dias quase toda a cavidade óssea estava preenchida por osso neoformado. No entanto, a formação óssea ainda era escassa no grupo fresa, limitando-se às bordas da cavidade óssea.

O laser pulsado de Er,Cr:YSGG utilizado opera num comprimento de onda de 2,78 μ m, que dentre o espectro de irradiação dos lasers, possui uma das maiores absorções em água, sendo aproximadamente 10 vezes maior do que a absorção do laser de CO₂, 200 vezes maior do que o laser de Ho:YSGG e 20.000 vezes maior do que o laser de Nd:YAG⁷⁶. Além das moléculas de água encontradas na constituição do tecido ósseo, a própria matriz orgânica e os sais de cálcio inorgânicos absorvem irradiação infravermelha entre 2,9 e 3,3 μ m³⁵. Assim, é possível compreender os bons resultados obtidos com o laser utilizado neste estudo, como produção de uma ablação definida e livre de partículas teciduais com mínimos sinais de necrose.

Até o surgimento do laser de Er,Cr:YSGG, o laser cirúrgico de CO₂ vinha sendo muito pesquisado para ablação tecidual, principalmente em tecido cutâneo.

No entanto, com base em nossos resultados e de acordo os achados de Arashiro DS *et al*⁵, 1996 e Sinha e Gallagher⁶⁵ em 2003, o laser de Er,Cr:YSGG parece ter vantagens superiores a este laser, produzindo mínimos danos térmicos aos tecidos adjacentes.

Os estudos de Friesen *et al*²³, 1999 e Nelson JS *et al*⁵¹, 1989 revelam que o uso de fresas convencionais para osteotomia não causam necrose tecidual, corroborando com nossos resultados. No entanto, no tecido ósseo o laser de Er,Cr:YSGG causa mínimos danos térmicos teciduais^{35,76-77}, sendo que no nosso estudo a mesma metodologia de Wang *et al*⁷⁶, 2002, foi empregada, porém, em calotas utilizando parâmetro de 3.0W de potência. Em todas as amostras irradiadas foi visível a formação de necrose óssea, no entanto, subjacente à esta área, lacunas de osteócitos vazias foram sendo lateralmente preenchidas por tecido ósseo neoformado. Apesar das amostras ainda apresentarem sinais de necrose aos 30 dias, a formação óssea já tinha se iniciado sete dias após a cirurgia, revelando que o dano térmico causado ao tecido ósseo foi mínimo.

Eriksson, Albrektsson¹⁴, em 1983, demonstraram que o limiar para que o osso permaneça vivo é de um aumento máximo de temperatura é de aproximadamente 10°C durante um minuto. De acordo com os resultados de Kimura *et al*³⁵, 2001, a irradiação com o laser de Er,Cr:YSGG com 5.0W e 8.0W por 10s teve um aumento menor que 4°C na temperatura, estando assim, aquém do limite de sobrevivência do tecido ósseo. Embora no nosso estudo não tenha sido feita esta avaliação, acredita-se que não tenha ocorrido grandes aumentos na temperatura, uma vez que o parâmetro de potência utilizado foi menor (2.0 e

3.0W) e os resultados histológicos apresentaram evidentes sinais de regeneração tecidual.

De acordo com as observações feitas por Wang *et al*⁷⁶, 2002, o mecanismo de ablação dos tecidos com o laser de Er,Cr:YSGG não está bem esclarecido, mas dois mecanismos são propostos. O primeiro seria a vaporização tecidual causada diretamente pelo efeito térmico do laser e o segundo mecanismo estaria relacionada com a alta absorção da luz laser pela água. Assim, a absorção da irradiação da energia do laser e sua conversão em energia térmica causa uma concentração local de calor que aquece a água ao seu ponto máximo de ebulição, causando micro-explosões que induzem fortes forças mecânicas às superfícies dos tecidos alvos^{35,77}. De acordo com estes autores e com base em nossos resultados, ambos mecanismos devem ocorrer durante a ablação óssea pelo laser de Er,Cr:YSGG. A carbonização do tecido ósseo mostra efeito térmico direto, enquanto as superfícies irregulares deste tecido, sustentam o mecanismo de micro-explosões.

Assim, fatores como comprimento de onda, potência, modo/duração/frequência do pulso e tempo de exposição são parâmetros importantes para se controlar as injúrias térmicas causadas aos tecidos circunvizinhos. Portanto, estes parâmetros devem ser cuidadosamente avaliados dependendo do procedimento clínico e do tecido a ser irradiado¹³.

Tanto os parâmetros do laser quanto uma correta proporção de água e ar são importantes para se evitar danos térmicos severos aos tecidos adjacentes⁷⁶. O laser de Er,Cr:YSGG utilizado opera num modo de liberação de água e ar,

formando um jato de spray, com função de resfriamento durante a confecção do defeito. Kang HW *et al*³¹, em 2008, observaram que o sistema de ablação por spray associado à este laser apresentou os menores danos térmicos no tecido ósseo.

No nosso estudo em dorso e calota o laser de Er,Cr:YSGG foi utilizado com proporção de 50-50% água e ar, respectivamente. A partir dos resultados, acredita-se que esta proporção tenha sido satisfatória, uma vez que as respostas histológicas de ambos os tecidos foram favoráveis e com mínimos sinais de necrose óssea.

De acordo com nossas observações e os estudos de Rizoui *et al*⁵⁷, 1996; Shah *et al*⁶², 1996 e Wang *et al*⁷⁷, 2005, torna-se evidente que a hemorragia é controlada com o uso do laser de Er,Cr:YSGG tanto em tecido mole quanto em osso. No entanto, para uma melhor hemostasia, Wang *et al*⁷⁷, 2005, sugerem que a proporção de água e ar deverá ser mínima e uma compressão realizada no local.

Ausência de sangramento, eliminação da necessidade de confecção de suturas, menores dores pós-operatórias e edema, são algumas vantagens clínicas do uso de lasers cirúrgicos nos tratamentos odontológicos^{5,13}.

Mesmo não tendo sido preconizado um tempo de irradiação neste estudo, o tecido mole foi incisado até o momento em que se observava a completa ablação da derme, não perfurando o tecido muscular. Na calota, a descontinuidade óssea era limitada pela dura-máter. Com os parâmetros utilizados, o laser de Er,Cr:YSGG facilmente incisou tecido mole e duro, levando um tempo máximo

de 10 segundos, corroborando com o tempo encontrado por Wang *et al*⁷⁷, em 2005.

Sendo o laser de Er,Cr:YSGG um laser de alta potência, o mesmo atua de maneira superficial, removendo tecido apenas no foco do feixe de luz. Assim, tivemos o cuidado de padronizar uma distância mínima de 3mm entre a linha sagital mediana e a região a ser criado o defeito na calota; no dorso, respeitava-se uma distância mínima de 5cm entre a linha sagital mediana e a região a ser incisada, formando-se uma distância de aproximadamente 6mm e 10 cm entre as duas incisões, respectivamente. Desta maneira, evitou-se qualquer interferência no processo inflamatório e na reparação tecidual que pudesse haver entre as duas incisões realizadas nestes tecidos.

Em relação ao tamanho do defeito criado, neste estudo realizou-se apenas incisões e defeitos lineares no diâmetro da ponta dos instrumentos utilizados: laser, bisturi e fresa. De acordo com o nosso propósito, esta metodologia foi adotada para que se pudessemos ter uma primeira avaliação da resposta do tecido mole e duro após irradiação com laser de Er,Cr:YSGG. Com base em nos resultados, o próximo passo seria a aplicação deste laser em defeitos críticos.

A análise histométrica confirmou os achados da avaliação histológica, onde foi evidente um maior percentual regenerativo em tecido ósseo nas amostras irradiadas com laser de Er,Cr:YSGG. Aos 15 e 30 dias a diferença entre a formação após o uso de fresa e laser foi estatisticamente significativa, sendo que a reparação tecidual foi maior nas amostras irradiadas com laser.

Diante dos resultados obtidos e com base na literatura discutida, existe cada vez mais embasamento científico para que o laser de Er,Cr:YSGG se torne um substituto aos instrumentos convencionais de cirurgias orais. Para isso, no entanto, mais pesquisas pré-clínicas são necessárias para se chegar a um parâmetro ideal de segurança e efetividade, fazendo deste laser um instrumento clínico de rotina.

6. Conclusão

Dentro das limitações deste trabalho e considerando os resultados, julgamos válidas as seguintes conclusões:

- A utilização do laser de Er,Cr:YSGG em tecido mole, nos parâmetros avaliados, ocasiona atraso em relação ao bisturi nos períodos iniciais de cicatrização, porém, sem comprometer o resultado final;
- Nos parâmetros avaliados no tecido ósseo, o emprego do laser de Er,Cr:YSGG promove maior formação óssea.

7. Referências Bibliográficas

1. Almeida-Lopes L. Laserterapia na Odontologia. *Biodonto*. 2004; 1: 11-87.
2. Ando Y, Aoki A, Watanabe H, Ishikawa I. Bactericidal effect of erbium YAG laser on periodontopathic bacteria. *Lasers Surg Med*. 1996; 19: 190-200.
3. Aoki A, Ando A, Watanabe H, Ishikawa I. In vitro studies on laser scaling of subgingival calculus with an Er:YAG Laser. *J Periodontol*. 1994; 65: 1097-106.
4. Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 2004; 36: 59-97.
5. Arashiro DS, Rapley JW, Cobb CM, Killoy WJ. Histologic evaluation of porcine skin incisions produced by CO₂ laser electrosurgery and scalpel. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1996; 16: 479-91.
6. Arnabat J, Escribano C, Fenosa A, Vinuesa T, Gay-Escoda C, Berini L, Viñas M. Bactericidal activity of erbium, chromium: yttrium-scandium-gallium-garnet laser in root canals. *Lasers Med Sci* 2009. Jun 23 [Epub ahead of print].

7. Bagnato VS. Os fundamentos da luz laser. Física Esc. 2001; 2: 4-9.
8. Ben Hatit Y, Blum R, Severin C, Maquin M, Jabro MH. The effects of a pulsed Nd:YAG laser on subgingival bacterial flora and on cementum: An in vivo study. J Clin Laser Med and Surg. 1996; 14: 137-43.
9. Borsatto MC, Torres CP, Chinelatti MA, Pécora JD, Corona SA, Palma-Dibb RG. Photomed Laser Surg. 2009; 27: 253-60.
10. Buchelt M, Kutschera HP, Katterschafka T, Kiss H, Lang S, Beer R, Losert U. Er:YAG and Hol:YAG laser osteotomy: the effect of laser ablation on bone healing. Laser Surg Med. 1994; 15: 373-81.
11. Burkes EJ Jr, Hoke J, Gomes E, Wolbarsht M. Wet versus dry enamel ablation by Er:YAG laser. J Prosthet Dent. 1992; 67: 847-51.
12. Crespi R, Cappare P, Toscanelli I, Gherlone E, Romanos GE. Effects of Er:YAG laser compared to ultrasonic scaler in periodontal treatment: a 2-year follow-up split-mouth clinical study. J Periodontol. 2007; 78: 1195-200.
13. D'Arcangelo C, Di Maio FN, Prosperi GD, Conte E, Baldi M, Caputi S. A preliminary study of healing of diode laser versus scalpel incisions in rat

oral tissue: a comparison of clinical, histological, and immunohistochemical results. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103: 764-73.

14. Eriksson AR, Albrektsson T. Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent.* 1983; 50: 101-07.
15. Ekworapoj P, Sidhu SK, McCabe JF. Effect of different power parameters of Er,Cr: YSGG laser on human dentine. *Lasers Surg Med.* 2007; 22: 175-82.
16. Eversole LR, Rizou IM. Preliminary investigations on the utility of an erbium-chromium YSGG laser. *J Calif Dent Assoc.* 1995; 23: 41-7.
17. Eversole LR, Rizou I, Kimmel AI. Pulpal response to cavity preparation by an erbium, chromium:YSGG laser-powered hydrokinetic system. *J Am Dent Assoc.* 1997; 128: 1099-106.
18. Firoozmand L, Faria R, Araujo MA, di Nicoló R, Huthala MF. Temperature rises in cavities prepared by high and low torque handpieces and ER:YAG laser. *Br Dent J.* 2008; 205: 28-9.

19. Folwaczny M, Mehl A, Haffner C, Benz C, Hickel R. Root substance removal with Er:YAG laser radiation at different parameters using a new delivery system. J Periodontol. 2000; 71: 147-55.

20. Food and Drug Administration. 510(k). Summary of Safety and Effectiveness Information: Waterlase Millennium, surgical laser instrument. [citado 2001 jul 3]. Disponível em: <http://www.fda.gov/cdrh/pdf/k011041.pdf>.

21. Food and Drug Administration. 510(k). Summary of Safety and Effectiveness Information: Waterlase Millennium, hydrokinetic tissue cutting system. [citado em 2002 fev 12]. Disponível em: <http://www.fda.gov/cdrh/pdf/k013908.pdf>.

22. Freitas PM, Navarro RS, Barros JA, de Paula EC. The use of Er:YAG laser for cavity preparation. An SEM evaluation. Microsc Res Tech. 2007; 70: 803-8.

23. Friesen LR, Cobb Cm, Rapley JW, Brokman LF, Spencer P. Laser irradiation of bone: II. Healing response following treatment by CO₂ and ND:YAG lasers. J Periodontol. 1999; 70: 75-83.

24. Fujii T, Baehni PC, Kawai O, Kawakami T, Matsuda K, Kowashi Y. Scanning electron microscopic study of the effects of Er:YAG laser on root cementum. *J Periodontol.* 1998; 69: 1283-90.
25. Geraldo-Martins VR, Tanji EY, Wetter NU, Nogueira RD, Eduardo CP. Intrapulpal temperature during preparation with the Er:YAG laser: an in vitro study. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23: 182-6.
26. Gontijo I, Navarro RS, Haypek P, Ciamponi AL, Haddad AE. The applications of diode and Er:YAG lasers in labial frenectomy in infant patients. *J Dent Child (Chic).* 2005; 72: 10-5.
27. Hakki SS, Berk G, Dundar N, Saglam M, Nukhet B. 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: 345-53.
28. Harashima T, Kinoshita J, Kimura Y, Brugnera A, Zanin F, Pecora JD, Matsumoto K. Morphological comparative study on ablation of dental hard tissues at cavity preparation by Er:YAG and Er,Cr:YSGG lasers. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23: 52-5.

29. Heitz-Mayfield LJA, Trombelli L, Heitz F, Needleman I, Moles D. A systematic review of the effect of surgical debridement vs. non-surgical debridement for the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 92-102.
30. Inamoto K, Horiba N, Senda S, Naitoh M, Arijji E, Senda A, Nakamura H. Possibility of root canal preparation by Er:YAG laser. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107: 47-55.
31. Kang HW, Oh J, Welch AJ. Investigations on laser hard tissue ablation under various environments. *Phys Med Biol.* 2008; 53: 3381-90.
32. Kelbauskiene S, Maciulskiene V. A pilot study of Er,Cr:YSGG laser therapy used as an adjunct to scaling and root planning in patients with early and moderate periodontitis. *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal.* 2007; 9: 21-6.
33. Kesler G, Romanos G, Koren R. Use of Er:YAG laser to improve osseointegration of titanium alloy implants--a comparison of bone healing. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006; 21: 375-9.

34. Kilinc E, Roshkind DM, Antonson SA, Antonson DE, Hardigan PC, Siegel SC, Thomas JW. Thermal safety of Er:YAG and Er,Cr:YSGG lasers in hard tissue removal. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27: 565-70.
35. Kimura Y, Yu D, Fujita A, Yamashita A, Murakami Y, Matsumoto K. Effects of Erbium, Chromium: YSGG laser irradiation on canine mandibular bone. *J Periodontol.* 2001; 72: 1178-82.
36. Kivanç BH, Ulusoy OI, Görgül G. Effects of Er:YAG laser and Nd:YAG laser treatment on the root canal dentin of human teeth: a SEM study. *Lasers Med Sci.* 2008; 23: 247-52.
37. Kornblit R, Bossù M, Mari D, Rocca JP, Polimeni A. Enamel and dentine of deciduous teeth Er:YAG laser prepared. A SEM study. *Eur J Paediatr Dent.* 2009; 10: 75-82.
38. König J, Schwahn C, Fanghänel J, Plötz J, Hoffmann T, Kocher T. Repeated scaling versus surgery in young adults with generalized advanced periodontitis. *J Periodontol.* 2008; 79: 1006-13.
39. Krmek SJ, Miletic I, Simeon P, Mehicić GP, Anić I, Radisić B. The temperature changes in the pulp chamber during cavity preparation with the Er:YAG laser using a very short pulse. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27: 351-5.

40. Leonardo MR, Guillén-Carías MG, Pécora JD, Ito IY, Silva LA. Er:YAG laser: antimicrobial effects in the root canals of dogs teeth with pulp necrosis and chronic periapical lesions. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23: 295-9.
41. Lewandrowski KU, Lorente C, Schomacker KT, Flotte TJ, Wilkes JW, Deutsch TF. Use of the Er:YAG laser for improved planting in maxillofacial surgery. *Lasers Surg Med.* 1996; 19: 40-5.
42. Lopes BM, Marcantonio RA, Thompson GM, Neves LH, Theodoro LH. Short-term clinical and immunologic effects of scaling and root planing with Er:YAG laser in chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2008; 79: 1158-67.
43. Lopes BMV, Theodoro LH, Melo RF, Thompson GMA, Marcantonio RAC. Clinical and microbiological follow-up evaluations after non-surgical periodontal treatment with Er:YAG laser and scaling and root planning. *J Periodontol.* 2010. Jan 27. [Ahead of print]
44. Lubart R, Kesler G, Lavie R, Friedmann H. Er:YAG laser promotes gingival wound repair by photo-dissociating water molecules. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23: 369-72.

45. Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature*. 1960; 187: 493-4.
46. Matsumoto K, et al. Clinical assessment of Er,Cr: YSGG laser application for cavity preparation. *J Clin Laser Med Surg*. 2002; 20: 17-21.
47. McDavid VG, Cobb CM, Rapley JW, Glaros AG, Spencer P. Laser irradiation of bone: III. Long-term healing following treatment by CO₂ and Nd:YAG lasers. *J Periodontol*. 2001; 72: 174-82.
48. Mello I, Robazza CR, Antoniazzi JH. Influence of ER:YAG laser irradiation on apical sealing of four different sealers. *Braz Dent J*. 2004; 15: 190-3.
49. Miller RJ. Treatment of the contaminated implant surface using the Er,Cr:YSGG laser. *Implant Dent*. 2004; 13: 165-70.
50. Moslemi M, Fekrazad R, Tadayon N, Ghorbani M, Torabzadeh H, Shadkar MM. Effects of Er,Cr:YSGG laser irradiation and fluoride treatment on acid resistance of the enamel. *Pediatr Dent*. 2009; 31: 409-13.

51. Nelson JS, Orestein A, Liaw LH, Berns MW. Mid-infrared erbium: YAG laser ablation of bone: the effect of laser osteotomy on bone healing. *Lasers Surg Med.* 1989; 9: 362-74.
52. Noori ZT, Fekrazad R, Eslami B, Etemadi A, Khosravi S, Mir M. Comparing the effects of root surface scaling with ultrasound instruments and Er,Cr:YSGG laser. *Lasers Surg Med.* 2008; 23: 283-7.
53. Olivi G, Angiero F, Benedicenti S, Iara G, Signore A, Kaitsas V. Use of the erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser on human enamel tissues. Influence of the air-water spray on the laser-tissue interaction: scanning electron microscope evaluations. *Lasers Med Sci.* 2009. Jun 23 [Epub ahead of print].
54. Perito MA, Jorge AC, de Freitas PM, Cassoni A, Rodrigues JA. Cavity preparation and restorative materials on the prevention of secondary caries. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27: 729-34.
55. Radvar M, Macfarlane TW, Mackenzie D, Whittres CJ, Payne A P, Kinane DF. An evaluation of the Nd:YAG laser in periodontal pocket therapy. *Br Dental J.* 1996; 180: 57-62.

56. Rizou IM, DeShazer LG. New laser-matter interaction concept to enhance hard tissue cutting efficiency. SPIE Proc. 1994; 2134A: 309-17.
57. Rizoui IM, Eversole LR, Kimmel AI. Effects of an erbium, chromium: yttrium, scandium, gallium, garnet laser on mucocutaneous soft tissues. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996; 82: 386-95.
58. Romanos GE, Nentwig GH. Regenerative therapy of deep peri-implant infrabony defects after CO2 laser implant surface decontamination. Int J Periodontics Restorative Dent. 2008; 28: 245-55.
59. Salina S, Maiorana C, Iezzi G, Colombo A, Fontana F, Piattelli A. Histological evaluation, in rabbit tibiae, of osseointegration of mini-implants in sites prepared with Er: YAG laser versus sites prepared with traditional burs. J Long Term Eff Med Implants. 2006; 16: 145-56.
60. Schwarz F, Olivier W, Herten M, Sager M, Chaker A, Becker J. Influence of implant bed preparation using an Er:YAG laser on the osseointegration of titanium implants: a histomorphometrical study in dogs. J Oral Rehabil. 2007; 34: 273-81.

61. Secilmis A, Usumez A, Usumez S, Berk G. Evaluation of mineral content of enamel prepared by erbium, chromium: yttrium-scandium-galium-garnet laser. *Lasers Med Sci* 2009. Mar 11 [Epub ahead of print].
62. Shah UK, Poe DS, Rebeiz EF, Perrault DF, Pankratov MM, Shapshay SM. Erbium laser in middle ear surgery: in vitro and in vivo animal study. *Laryngoscope*. 1996; 106: 418-22.
63. Shahabi S, Zendedel S. Atomic analysis and hardness measurement of the cavity prepared by laser. *Lasers Med Sci* 2009. [Epub 2009 Jul 3].
64. Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RFM, Garcia VG, Marcantonio Jr E. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. *J Oral Sci*. 2003; 45: 17-23.
65. Sinha UK, Gallagher LA. Effects of steel scalpel, ultrasonic scalpel, CO2 laser, and monopolar and bipolar electrosurgery on wound healing in guinea pig oral mucosa. *Laryngoscope*. 2003; 113: 228-36.
66. Sohn DS, Lee JS, An KM, Romanos GE. Erbium, chromium: yttrium-scandium-gallium-garnet laser-assisted sinus graft procedure. *Lasers Med Sci*. 2009; 24: 673-77.

67. Stern, RH, Sognaes, RF. Laser effect on dental hard tissues. A preliminary report. *J South Calif Dent Assoc.* 1965; 33: 17-9.
68. Stübinger S, Homann F, Etter C, Miskiewicz M, Wieland M, Sader R. Effect of Er:YAG, CO₂ and diode laser irradiation on surface properties of zirconia endosseous dental implants. *Lasers Surg Med.* 2008; 40: 223-8.
69. Stübinger S, Ghanaati S, Saldamli B, Kirkpatrick CJ, Sader R. Er:YAG laser osteotomy: preliminary clinical and histological results of a new technique for contact-free bone surgery. *Eur Surg Res.* 2009; 42: 150-6.
70. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Kikuchi S, Oda S, Ishikawa I. Er:YAG laser therapy for peri-implant infection: a histological study. *Lasers Med Sci.* 2007; 22: 143-57.
71. Theodoro LH, Garcia VG, Haypek P, Zezell DM, Eduardo Cde P. Morphologic analysis, by means of scanning electron microscopy, of the effect of Er: YAG laser on root surfaces submitted to scaling and root planing. *Pesqui Odontol Bras.* 2002; 16: 308-12.

72. Theodoro LH, Sampaio JEC, Haypek P, Bachmann L, Zezell DM, Garcia VG. Effect of Er:YAG and Diode lasers on the adhesion of blood components and on the morphology of irradiated root surfaces. *J Periodont Res.* 2006; 41: 381-90.
73. Ting CC, Fukuda M, Watanabe T, Aoki T, Sanaoka A, Noguchi T. Effects of Er, Cr: YSGG laser irradiation on root surface: morphologic analysis and efficiency of calculus removal. *J Periodontol.* 2007; 78: 2156-64.
74. Toomarian L, Fekrazad R, Sharifi D, Baghaei M, Rahimi H, Eslami B. Histopathological evaluation of pulpotomy with Er,Cr:YSGG laser vs formocresol. *Laser in Med Sci.* 2008; 23: 443-50.
75. Visuri SR, Walsh JT Jr, Wigdor HA. Erbium laser ablation of dental hard tissue: effect of water cooling. *Lasers Surg Med.* 1996; 18: 294-300.
76. Wang X, Ishizaki N, 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: 245-50.
77. 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 Scie.* 2005; 20: 21-7.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 10 de março de 2010.

LIVIA RODRIGUES PERUSSI