

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

Valmir Campos Macarimi

Influência do laser em baixa intensidade
(660 *nm*) no processo de reparo de feridas cutâneas
provocadas em ratos tratados com nicotina.
Estudo histológico.

ARAÇATUBA
2004

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

Valmir Campos Macarimi

Influência do laser em baixa intensidade
(660 nm) no processo de reparo de feridas cutâneas
provocadas em ratos tratados com nicotina.
Estudo histológico.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, do Câmpus de Araçatuba, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia – Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

ARAÇATUBA
2004

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

M115i Macarimi, Valmir Campos
Influência do laser em baixa intensidade (660 nm) no processo de reparo em feridas cutâneas provocadas em ratos tratados com nicotina : estudo histológico / Valmir Campos Macarimi. – Araçatuba : [s.n.], 2004
121 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2004
Orientador: Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

1. Cicatrização de feridas 2. Lasers 3. Ratos 4. Periodontia
5. Nicotina

Black D6
CDD 617.63

Dados Curriculares

Valmir Campos Macarimi

Nascimento: 10 de Abril 1958 – Presidente Prudente – SP

Filiação: Agenor Macarimi
Maria Aparecida Campos Macarimi

1977/1980: Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente.

1982/1983: Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Especialização,
na Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

1984/1985: Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível de Especialização,
na Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

2003/2004: Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível de Mestrado , na
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Dedicatória

Dedico à minha esposa, *Maria Angélica* este trabalho. Seu empenho e compreensão foram fundamentais no decorrer de incansáveis horas de estudo e labuta.

Às minhas filhas, *Maria Flávia* e *Maria Júlia*, pelos doces momentos vividos e pela aventura de tê-las.

Aos meus pais, *Agenor* e *Maria Aparecida*, por todos os dias de luta que dedicaram à minha formação e à de meus irmãos.

Aos meus irmãos, *Vanda*, *Marcos*, *Márcio* e *Valéria* pela nossa infância e outras travessuras.

À minha avó *Elvira*, "*in memoriam*", por todo carinho e bondade que me transmitiu enquanto viveu.

Aos meus amigos verdadeiros.

"Do amor desmedido, fiz-me."
VCM

Ao amigo e Professor *Valdir Gouveia Garcia*, minha gratidão eterna pela orientação, amizade, paciência e, sobretudo, pela confiança em mim depositada. Seus exemplos de humildade e seu apreço pelo ser humano e pela pesquisa, mais do que comoventes, serão objeto de reflexão por toda minha vida.

Ao amigo e Professor Alvaro Francisco Bosco, pela distinção pessoal e profissional com que sempre me acolheu. Minhas palavras não seriam capazes de dimensionar sua importância para toda uma geração de periodontistas e, pessoalmente, para mim.

À Professora e amiga Maria José Hitomi Nagata, meu reconhecimento pela nobreza das suas palavras de ensinamento, disciplina e incentivo.

*"Ao espelhar-me em vós,
Banhei-me um pouco com saber".
VCM*

Aos meus velhos, novos e fraternos amigos Danielle Shima Luize, Juliano Milanezi de Almeida e Samara Bonfante, meu sincero afeto pela imensurável ajuda em todos os períodos do meu curso, principalmente na árdua concretização dos trabalhos experimentais. O desprendimento e o companheirismo demonstrados nos momentos de alegria e nos de seriedade evidenciaram as verdadeiras dimensões da palavra amizade, sem a qual este trabalho não teria sido realizado. Obrigado por me permitirem chegar até aqui.

À minha especial amiga Flávia Furlaneto, meu muito obrigado pela grande ajuda e amizade, sobretudo nos momentos finais de formatação e revisão.

À amiga e colega Tatiana Deliberador, pela convivência carinhosa e solidária, compartilhada durante todo o nosso curso de pós-graduação.

*"Vã é a fragrância da brisa,
Também a negritude da noite.
Mas não o álamo da gratidão".
VCM*

Ao Digníssimo diretor e vice-diretor da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP, Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin e Prof. Dr. Celio Percinotto, pela oportunidade da realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Tetuo Okamoto, cuja gentileza e atenção avalizaram os resultados deste trabalho.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Milanezi, grande formador de profissionais e de professores, que me honrou com sinceras palavras de estímulo.

A Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Rubo de Rezende, meus especiais agradecimentos pelo companheirismo e ensinamento de tantos anos.

Ao Prof. Dr. Sebastião Jorge Chammé, “in memoriam”, que, enquanto viveu, auxiliou-me sobremaneira nas disciplinas básicas de metodologia do ensino e da pesquisa, além de ter sido grande amigo e incentivador constante.

À Prof^a. Dr^a. Letícia Helena Theodoro, por participar das revisões, enriquecendo meu trabalho com sugestões e apoio.

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Poi, que trouxe novos parâmetros aos métodos de ensino, com sensibilidade e valorização do ser humano.

Ao Prof. Dr. e grande amigo Celso Kendji Nishiyama, pela fraternidade e pela confiança em mim depositadas durante todos esses anos.

Ao Dr. Haroldo Lima de Castro, que, por muito tempo, tem sido o amigo, o professor e companheiro de profissão, oferecendo segurança e coleguismo à difícil carreira da odontologia.

Ao Prof. Dr. Acir Lima de Castro, por ter me ensinado, desde o início da minha formação profissional, os valores da observação e da sensibilidade no diagnóstico.

Ao Prof. Dr. José Humberto Damante, por me ajudar a compreender como pode ser grande a nossa profissão.

Ao Prof. Dr. Mario Eduardo Alves Algodoal, por refletir e demonstrar o amor ao ensino da Periodontia.

Ao Prof. Dr. Alceu Berbert, por cujas mãos iniciei o estimulante processo de amar a profissão.

Às amigas e colegas Lu Gasparini e Olívia, pelo companheirismo e cordialidade durante as clínicas de pós-graduação.

À amiga e colega Joseane Maria Dias Bosco, cujo auxílio e amizade foram fundamentais, sobretudo no período inicial do meu curso.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, especialmente à Antonia, Dirce, Cleide, Bernadete e ao Gilmar, pelo carinho e atenção dispensados a mim.

À FUNDUNESP, pelo auxílio financeiro para a realização da presente pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho da Faculdade de Fisioterapia de Presidente Prudente - UNESP, pelo grande auxílio.

Aos funcionários do Biotério, Camilo e Odair, sempre atenciosos e zelosos com nossos trabalhos.

Aos funcionários da secretaria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP.

Às queridas professoras Vera Sônia, Nadiege e Clara Helena, pelas sugestões na revisão das minhas dedicatórias e agradecimentos.

À professora Arlene Maria Soares Correia, pela colaboração no “abstract”.

A todos os funcionários da Biblioteca, sempre muito gentis e competentes.

A todos aqueles que, por minha injusta memória, não tenham sido lembrados aqui.

Ao altíssimo, que mantém acesa a chama da esperança.

*“ Caminheiro é o que sou,
na fímbria ensolarada da nova manhã.”
VCM*

Epígrafe

*“ O importante é que a nossa
emoção sobreviva ”*

Paulo César Pinheiro

SUMÁRIO

1. Introdução	24
2. Revisão de Literatura	31
2.1 Nicotina	32
2.2 Laser de Baixa Intensidade	47
3. Proposição	62
4. Material e Método	64
4.1. Preparo da droga	67
4.2. Administração das soluções de Hemissulfato de Nicotina e solução fisiológica de cloreto de sódio	67
4.3. Procedimento Cirúrgico e aplicação do Laser	69
4.4. Sacrifício dos animais	72
5. Resultado	73
6. Discussão	98
7. Conclusão	107
Referências	109

LISTA DE ABREVIATURAS

nm = nanômetro

PGDF = Fator de crescimento derivado de plaquetas

PAF = Fator de ativação das plaquetas

LILT = Low intensity laser therapy

LLLT = Low level laser therapy

He-Ne = Hélio neônio

AsGa = Arseneto de Gálio

AsGaAl = Arseneto de Gálio e Alumínio

AsGaAlIn = Arseneto de Gálio Alumínio Índio

mW = Megawatts

O₂ = Oxigênio

ng/ml = Nanogramas por mililitros

cm = centímetro

mg/kg = Miligrama por Kilo

sICAM-1 = Moléculas de adesão -1

µg/ml = Micrograma por mililitro

mg/ml = Miligrama por mililitro

g = Gramas

mm = milímetro

cm³ = Centímetro cúbico

MMP-8 = Metaloproteinase da Matriz -8

α-1-AT = Alfa - 1 - Antitripsina

α-2-MG = Alfa - 2 - Macroglobulina

µl = Microlitros

J/cm² = Joules por centímetro quadrado

ATP = Adenosina Trifosfato

°C = Graus Celsius

H.E. = hematoxilina e eosina

Lista de Figuras		pg
Figura 1	Apresentação comercial da Nicotina.	67
Figura 2	Modo de aplicação do Hemissulfato de nicotina e da solução fisiológica de cloreto de sódio.	68
Figura 3	Apresentação do tipo de anestésico utilizado.	69
Figura 4	Tricotomia da região dorsal.	69
Figura 5	Posicionamento do “punch.”	70
Figura 6	Ferida cirúrgica provocada pelo “punch.”	70
Figura 7	Emissor Laser de baixa potência utilizado.	71
Figura 8	Aplicação contato pontual do laser na borda da ferida.	71
Figura 9	Aplicação contato pontual do laser no centro da ferida.	71
Figura 10	Grupo I (Soro fisiológico). 3 dias. Próximo à borda da ferida, os espécimes apresentam extensas áreas ocupadas por infiltrado inflamatório com predominância de polimorfonucleares neutrófilos, muitos dos quais em processo degenerativo. Nota-se a ausência de recobrimento epitelial e predominância de macrófagos e linfócitos no conjuntivo subjacente. H.E. Aumento original 160 X.	79
Figura 11	Grupo II (Soro fisiológico + Laser). 3 dias. Junto às bordas da ferida nota-se a presença de crosta e superfície ocupada por numerosos polimorfonucleares neutrófilos, alguns em degeneração. Nas áreas mais profundas evidencia-se pequeno número de fibroblastos, além de alguns macrófagos e linfócitos. H.E. Aumento original 160 X.	80

Figura 12	Grupo II (Soro fisiológico + Laser) 3 dias. Observa-se delgada camada ocupada por polimorfonucleares neutrófilos em degeneração. Discreto número de fibroblastos associados a raros linfócitos são evidenciados nas camadas mais profundas. H.E. Aumento original 160 X.	81
Figura 13	Grupo III (Nicotina). 3 dias. Próximo à borda da ferida observa-se áreas ocupadas por neutrófilos degenerados e ausência de proliferação epitelial. Nas áreas mais afastadas do centro da lesão, observa-se extensa área ocupada por moderado número de polimorfonucleares neutrófilos e linfócitos. H.E. Aumento original 160 X	82
Figura 14	Grupo III (Nicotina). 3 dias. Área mais afastada do centro da lesão observa-se extensa área ocupada por moderado número de polimorfonucleares neutrófilos e linfócitos. Nas áreas mais afastadas da superfície, a população celular é mais discreta. H.E. Aumento original. 160 X. Neutrófilos em degeneração (Nd); neutrófilos (N); linfócitos (L).	83
Figurar 15	Grupo IV (Nicotina + Laser). 3 dias. Observa-se faixa ocupada por pequeno número de fibroblastos, macrófagos e linfócitos ao lado de alguns neutrófilos na porção central da lesão. H.E. Aumento original 160X.	84
Figura 16	Grupo IV (Nicotina + Laser). 3 dias. A Superfície da ferida mostra, junto às bordas, áreas densamente ocupadas por elevado número de células, principalmente polimorfonucleares neutrófilos, muitos em degeneração. Contiguamente existe discreta faixa ocupada por pequeno número de macrófagos, linfócitos e fibroblastos. H.E. Aumento original 160 X.	85
Figura 17	Grupo I (Soro fisiológico). 7 dias. Nas bordas da ferida, observa-se proliferação epitelial com espessa camada. O tecido conjuntivo subjacente apresenta moderado número de fibroblastos ao lado de alguns macrófagos e linfócitos. H.E. Aumento original 160 X.	86
Figura 18	Grupo I (Soro fisiológico). 7 dias. O tecido conjuntivo subjacente apresenta moderado número de fibroblastos ao lado de alguns macrófagos e linfócitos. Em direção ao centro da ferida, o tecido conjuntivo subepitelial mostra numerosos capilares neoformados, discreto	87

	número de fibroblastos ao lado de macrófagos e linfócitos. H.E. Aumento original 160 X.	
Figura 19	Grupo II (Soro fisiológico + Laser). 7 dias. Evidência de recobrimento epitelial da ferida cirúrgica em sua totalidade, com alguns pontos de epitélio bem diferenciado. O conjuntivo subjacente apresenta-se pouco desenvolvido com número moderado de fibroblastos sem orientação definida. H.E. Aumento original 160 X.	88
Figura 20	Grupo III (Nicotina). 7 dias. Observa-se espessa camada de crosta em toda extensão da ferida seguida de faixa ocupada por polimorfonucleares neutrófilos, muitos dos quais em processo de degeneração. Notam-se áreas extensas ocupadas por exsudato inflamatório nas áreas mais profundas além de pequeno número de macrófagos e linfócitos. H.E. Aumento original 63 X.	89
Figura 21	Grupo III (Nicotina). 7 dias. Nas áreas mais profundas o tecido conjuntivo evidencia extensas áreas ocupadas por infiltrado inflamatório, alguns fibroblastos, macrófagos e linfócitos ao lado de vasos sanguíneos. H.E. Aumento original 160 X.	90
Figura 22	Grupo IV (Nicotina + Laser). 7 dias. Tecido epitelial recobre a totalidade da ferida cirúrgica, mostrando-se pouco diferenciado. O tecido conjuntivo mostra-se pouco diferenciado evidenciando moderado número de fibroblastos, linfócitos e macrófagos. H.E. Aumento original 63 X.	91
Figura 23	Grupo IV (Nicotina + Laser). 7 dias. Tecido conjuntivo mostra-se pouco diferenciado evidenciando moderado número de fibroblastos, linfócitos e macrófagos. H.E. Aumento original 160 X.	92
Figura 24	Grupo I (Soro fisiológico). 14 dias. O epitélio recobre a ferida cirúrgica, mostrando-se bem desenvolvido em alguns pontos. O conjuntivo subjacente é bem diferenciado, com moderado número de fibroblastos dispostos paralelamente à superfície epitelial. H.E. Aumento original 160 X.	93

Figura 25	Grupo II (Soro fisiológico + Laser). 14 dias. O Tecido epitelial recobre totalmente a ferida mostrando-se pouco diferenciado. O Tecido conjuntivo subjacente apresenta-se bem desenvolvido com discreto número de fibroblastos orientados paralelamente à superfície do epitélio. H.E. Aumento original 160 X.	94
Figura 26	Grupo III (Nicotina) 14 dias. Recobrimento epitelial parcial e pouco diferenciado. Tecido conjuntivo subjacente pouco desenvolvido, observando-se numerosos fibroblastos ao lado de macrófagos e linfócitos. Em direção ao centro da ferida, nota-se área ocupada por polimorfonucleares neutrófilos sobre a superfície da lesão, muitos dos quais em degeneração. Mais profundamente observa-se discreto número de fibroblastos ao lado de macrófagos e linfócitos. H.E. Aumento original 160 X.	95
Figura 27	Grupo III (Nicotina) 14 dias. Tecido conjuntivo subjacente pouco desenvolvido, observando-se numerosos fibroblastos ao lado de macrófagos e linfócitos. Em direção ao centro da ferida, nota-se área ocupada por polimorfonucleares neutrófilos sobre a superfície da lesão, muitos dos quais em degeneração. Mais profundamente observa-se discreto número de fibroblastos ao lado de macrófagos e linfócitos. H.E. Aumento original 160 X.	96
Figura 28	Grupo IV (Nicotina + Laser). 14 dias. O Tecido epitelial recobre a ferida cirúrgica em sua totalidade mostrando-se pouco diferenciado. O Tecido conjuntivo subjacente é bem diferenciado com fibroblastos orientados paralelamente à superfície do epitélio. Nas áreas mais afastadas da borda da ferida, o conjuntivo apresenta maior número de fibroblastos. H.E. Aumento original 160 X.	97

Resumo

RESUMO

MACARINI, V.C. Influência do laser em baixa intensidade (660 nm) no processo de reparo em feridas cutâneas provocadas em ratos tratados com nicotina. Estudo histológico. Araçatuba, 2004. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

A proposta do presente estudo foi avaliar, histologicamente a influência da terapia do laser em baixa intensidade (LLLT) sobre o processo de reparo em feridas cutâneas provocadas no dorso de ratos tratados com nicotina. Foram utilizados 115 ratos neste estudo. Cinquenta e nove ratos receberam injeção subcutânea de solução salina (0,2 ml), enquanto o restante dos animais receberam injeção subcutânea de nicotina (3mg/Kg de peso do animal), duas vezes ao dia durante todo o período experimental. Decorridos 30 dias das aplicações, foi criada uma ferida cirúrgica sobre o dorso de cada animal por meio de um *punch* (8 mm de diâmetro). Os animais que receberam solução salina foram divididos em 2 grupos: **Grupo I**(Controle)(n=29) - As feridas permaneceram sem nenhum tratamento enquanto as do **Grupo II** (n=30) foram submetidas a tratamento com LLLT (AlGaAs)660 nm, 40 mW, 3.0 J, 0,56 w/cm²). Os animais que receberam injeção subcutânea de nicotina também foram divididos em 2 grupos. **Grupo III** (n=29) onde as feridas não receberam nenhum tratamento; e **Grupo IV** (n=27), no qual os animais receberam tratamento com LLLT (660 nm, 40 mW, 3,0 J, 0,56 W/cm²). Cada

grupo foi subdividido em sub-grupos para eutanásia aos 3, 7 e 14 dias pós-operatórios.

As peças foram processadas rotineiramente para análise histológica usando-se coloração com hematoxilina e eosina.

O Grupo III mostrou retardo da migração epitelial e na organização do tecido conjuntivo quando comparado com o Grupo I (controle). As feridas do Grupo II apresentaram um processo de reparo acelerado quando comparadas às do Grupo I, assim como as feridas do Grupo IV apresentaram um reparo mais avançado em relação ao Grupo III.

Dentre dos limites deste estudo, pode-se concluir que a nicotina retarda, enquanto o LLLT acelera o processo de reparo de feridas cutâneas em todo o período experimental.

Palavras-chave: laser em baixa intensidade, cicatrização de feridas, ratos, fototerapia.

Abstract

ABSTRACT

MACARINI, V.C. Influence of low level laser therapy on the healing process of coetaneous wounds in rats treated with nicotine. A histological study.

The purpose of this study was to histologically analyze the influence of low level laser therapy (LLLT) on the healing process of surgically created coetaneous wounds in rats treated with nicotine. One hundred and fifteen rats were used in this study. Fifty nine rats received subcutaneous injection of saline (0,2 ml) while the remaining animals received subcutaneous injection of nicotine (3 mg/kg of body weight) twice a day during all experimental period. After 30 days of either saline or nicotine injection, coetaneous wounds were surgically created on the back of the animals with a punch (8 mm in diameter). The animals that received saline injections were divided into 2 groups: Group I (control) (n= 29) – The wound was left untreated; and Group II (n= 30) – The wound was treated with LLLT (GaAIAs 660 nm, 40 mW, 3.0 J, 0.56 W/cm²). The animals that received nicotine injections were also divided into 2 groups: Group III (n= 29) - The wound was left untreated; and Group IV (n= 27) – The wound was treated with LLLT (GaAIAs 660 nm, 40 mW, 3.0 J, 0.56 W/cm²). Each group was subdivided into sub-groups for euthanasia at either 3, 7 or 14 days post-operative. Block sections were routinely processed for histological analysis using H&E stain. Group III showed delayed epithelial migration and connective tissue organization when compared to Group I. The wounds of Group II presented an

accelerated healing process when compared to the ones of Group I, as well as the wounds of Group IV showed a more advanced healing when compared to the ones of Group III. Within the limits of this study, it can be concluded that nicotine delayed while LLLT accelerated the healing process of coetaneous wounds in all experimental periods.

Key words: low-power intensity, wound healing, rats, phototerapy.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O processo de reparação é comandado por “cascatas celulares” altamente organizadas, reguladas por vários mediadores químicos e fatores de crescimento, além da interação da ferida com fatores ambientais (FONTANA, 1996). Uma seqüência previsível de eventos biológicos ocorre no processo reparativo diante de uma dilaceração tecidual accidental ou através de um procedimento cirúrgico (PEACOCK ; WINKLE, 1976; POLLACK, 1979).

Os eventos biológicos envolvidos neste processo podem ser divididos em três fases distintas (FONTANA, 1996; VILJANTO, 1964): a) Fase exsudativa; b) fase proliferativa e c) fase de maturação ou formação de cicatriz.

A fase exsudativa inicia-se imediatamente após a injúria e pode durar em torno de aproximadamente 72 horas. Conhecida também como fase inflamatória ou destrutiva é caracterizada não só pelo surgimento de elementos celulares como também do fibrinogênio além de várias proteínas, decorrentes da penetração do sangue no ferimento. Junto aos fluídos teciduais uma rede de fibrina é formada e que logo se coagula na superfície da ferida. Esta ocorrência é acompanhada de vasodilatação seguida do “extravazamento de líquidos” do interior dos vasos levando substâncias nutrientes fundamentais para o processo de cicatrização. Ainda nestas primeiras horas, vários mediadores químicos também são liberados no local tais como: fator de crescimento derivado das plaquetas (PGDF), fator de ativação das plaquetas (PAF), tromboxano, serotonina, adrenalina e fatores do complemento (FONTANA, 1996). Simultaneamente, há um rápido aumento do número de células inflamatórias, sobretudo de leucócitos polimorfonucleares, além de desintegração das células e restos teciduais

comprometidos pela injúria. Em poucas horas, a superfície da ferida torna-se seca em função do processo de coagulação sanguínea e evaporação da umidade (POLLACK, 1979) sendo que a remoção de todo material necrótico da ferida determina o fim da fase exsudativa (VILJANTO, 1964).

Na fase proliferativa, a ferida é invadida por células do tecido conjuntivo, como fibroblastos e seus progenitores mesenquimais, que se dividem e ocupam a cavidade provocada pela ferida (LIPPER et al., 1980; RUDOLPH et al., 1977; VILJANTO, 1964). São observados nesta fase ao longo do tecido injuriado, pequenos vasos sanguíneos dilatados com aumento da permeabilidade (ROBBINS et al., 1984; RYAN; MAJNO, 1977).

O número de capilares e arteríolas aumenta e são mais numerosos entre 32 horas até o oitavo dia após o realização da ferida (GABBIANI; MONTANDON, 1977; ROBBINS et al., 1984; ROSS, 1968; VILJANTO, 1964).

A quantidade de vasos linfáticos também aumenta simultaneamente e o tecido de granulação preenche a ferida gradualmente. Esta fase desenvolve-se 24 horas após a injúria e se estende, no máximo, até 14 dias (FONTANA, 1996).

Na fase de maturação é relevante a formação de um novo tecido conjuntivo. A vascularização e celularização do tecido injuriado diminuem enquanto cresce a quantidade de fibras colágenas. A intensa proliferação fibroblástica e subsequente deposição de colágeno intercelular resultam numa maturação das fibras de colágeno e, desta forma uma cicatriz de tecido conjuntivo é iniciada (FONTANA, 1996; ROBBINS et al. 1984; VILJANTO, 1964).

Por outro lado, dentro de algumas horas após a realização da ferida, o arranjo normal e ordenado das células epiteliais é rompido ocorrendo mudanças na

morfologia e função celular. Estas deixam de executar suas funções normais de formação de queratina e passam a processar funções de multiplicação e migração celular. As células epiteliais orientam-se em sua migração pela rede de fibrina que funciona como uma proteção sobre a qual as células migram sobre o ferimento (BULLOUGH ; LAWRENCE, 1964). As células continuam o processo de migração até entrarem em contato com a massa de células epiteliais do lado oposto formando rapidamente desmossomos a partir do que, começam a retornar à sua forma e função normais, passando a secretar queratina, enquanto o tecido conjuntivo continua o processo de maturação e de contração.

A contração da ferida é proporcionada por uma forma especializada de fibroblastos. Estes fibroblastos possuem bandas bem desenvolvidas de microfilamentos contráteis compostos de actinmiosina e proteínas actino-associadas presentes no citoplasma celular e, por esta razão, são também denominadas de miofibroblastos (FONTANA, 1996; GABIANNI et al., 1971,1972; POLLACK, 1979; FONTANA, 1996).

Os miofibroblastos têm numerosas junções com os miofibroblastos vizinhos ou com a lâmina basal subjacente, o que lhes permite transmitir contrações a outros miofibroblastos, a fim de que todo o tecido conjuntivo seja afetado quando as células se contraem (ALBERTS et al. 1983; LIPPER et al. 1980). A ferida sofre uma contração de forma centrípeta, guiada pelas suas bordas em direção a região central (MONTANDON et al., 1977) formando uma cicatriz menor que a ferida inicial.

Quando a ferida está completamente reparada, os finos microfilamentos de actinmiosina desaparecem do citoplasma dos miofibroblastos e nenhuma junção é observada no contato entre os fibroblastos (GABIANNI, 1979; RUNGGER-BRANDLE; GABIANNI, 1983), caracterizando a completa reparação do tecido injuriado.

Embora o processo de reparo seja um evento biológico conhecido e de fundamental importância para a qualidade de vida dos indivíduos, sabe-se que muitos fatores estão associados a sua completa ocorrência. Fatores locais, como tipo de injúria e intensidade do trauma, além da presença de infecção, podem interferir na evolução do processo de cicatrização (ROBBINS et al., 1984). Além dos fatores locais, alguns distúrbios sistêmicos como diabetes e desnutrição também concorrem negativamente para reparação tecidual.

Por outro lado, muitas formas de se estimular ou favorecer o processo de cicatrização são conhecidas, desde o controle da infecção e modulação da resposta inflamatória até as aplicações tópicas de calor e fármacos.

Com o advento do primeiro emissor laser criado por Theodore Maiman (1960), utilizando o cristal de rubi como meio ativo, uma nova era na ciência biológica parece ter surgido, auxiliando a medicina e a odontologia, tanto nos procedimentos cirúrgicos propriamente ditos, como na prevenção e terapêutica.

Existe uma grande variedade de lasers apresentados na literatura, divididos em 2 grandes grupos : a) lasers de baixa intensidade, também conhecido como laser de bioestimulação, fotobioestimulação, laser macio, laser atérmico, LILT (Low Intensity Laser Therapy), LLLT (Low Level Laser Therapy) e b) Laser de alta intensidade, também conhecidos como laser cirúrgico, laser cruento, laser de potência (COLLS, 1984; STRANG et al., 1988).

Entre os lasers de baixa intensidade de potência encontramos: a) laser de Hélio – Neônio (He-Ne) de emissão contínua, potência que poderá oscilar entre 1 a 50 mW, sendo que 10 mW é a potência média mais utilizada na área médica e odontológica.

Emite comprimento de onda de 632,8 nanômetros o que o torna visível no espectro eletromagnético, com luz de cor vermelha; b) laser díodo ou semicondutores, os mais utilizados são o de arseneto de Gálio (AsGa) ou o de arseneto de gálio e alumínio (AsGaAl) e mais recentemente o de AsGaAlIn (arseneto de gálio, alumínio e índio); estes constituem-se na forma mais revolucionária, pois são de pequeno porte, sensíveis e eficientes.

A interação da luz laser com os tecidos biológicos processa-se de diferentes formas, dependendo do tipo de emissor utilizado (MISERENDINO; PICK, 1995): 1) Interação fotoquímica; 2) Interação fototérmica; 3) Interação fotomecânica e 4) Interação fotoelétrica.

Os lasers de fotobioestimulação são fundamentados em sua capacidade de promoverem, a nível celular, efeitos estimuladores sobre os processos moleculares e bioquímicos, que ocorrem normalmente durante os intrínsecos mecanismos da reparação tecidual, caracterizando desta forma a “Interação fotoquímica”, típica destes emissores lasers.

O interesse pela ação dos lasers em baixa intensidade tem crescido muito nas últimas décadas. Tal fato pode ser comprovado pela quantidade significativa de publicações científicas de experimentos realizados não só em animais de laboratório, bem como relatos de casos clínicos tratados com os diversos tipos de lasers em baixa intensidade (AL-WATBAN; ZHANG, 1996; AVERBAKH et al., 1976; BISHT et al., 1994; GARCIA, 1992; KAMEYA et al., 1995; KANA et al., 1981; LEE et al., 1993; LOCCI JR, 2002; LOWE et al., 1998; MESTER et al., 1968; MESTER et al., 1971; MESTER, 1973; MESTER et al., 1976; MESTER et al., 1978; MESTER; JASZSAGI-NAGI, 1973; SOARES et al., 1989; WOODRUFF et al., 2004).

Está largamente documentado na literatura que o processo de reparo pode sofrer várias intercorrências locais e ou sistêmicas, as quais podem interferir no complexo processo biológico de reparo das feridas. O tabagismo tem sido descrito como importante fator negativo no processo de reparação tecidual, sobretudo pelo consumo da nicotina, uma das mais nocivas substâncias encontradas no cigarro. Estudos revelam que a nicotina proveniente dos produtos do tabaco causa vasoconstrição periférica (GILMAN et al., 1990), isquemia tecidual e diminuição da tensão de oxigênio (JENSEN et al., 1991), JONES e TRIPLET (1992) relataram que a nicotina pode retardar o processo de reparo em torno de 80% para os fumantes comparado aos 10% dos não fumantes, inviabilizando inclusive a indicação de enxertos ósseos para os pacientes fumantes. Outros autores salientam que a nicotina pode inibir a microvascularização, mas não impedir a revascularização em áreas tratadas com enxerto ósseo em coelhos (DAFTARI et al., 1994). PINTO et al. (2002) chamam a atenção que a nicotina pode interferir nos eventos da reparação tecidual, na angiogênese e na re-epitelização de feridas.

Diante da escassez de trabalhos que atestem a viabilidade do uso do laser de baixa intensidade sobre os eventos da reparação em modelos de feridas retardadas pelo uso da nicotina, a elaboração deste trabalho foi motivada.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

Com o objetivo de facilitar o entendimento, a presente revisão será apresentada em duas partes:

2.1. Publicações que se referem à interferência da nicotina no processo de reparo;

2.2. Publicações relacionadas à ação do laser de baixa intensidade no processo de reparo de feridas cirúrgicas.

2.1. INTERFERÊNCIA DA NICOTINA NO PROCESSO DE REPARO

As implicações clínicas da nicotina, em função de sua toxicidade ao organismo, são especialmente relevantes, sobretudo por sua tendência em gerar dependência química em seus usuários.

A nicotina é um alcalóide natural que provoca alterações complexas e imprevisíveis ao corpo humano, quando administrada através de sua ação sobre vários locais neuroefetores e quimiossensíveis, e também pelo fato de o alcalóide ser capaz de estimular e dessensibilizar receptores. Este fármaco tem a capacidade de aumentar a frequência cardíaca por estimulação do sistema nervoso simpático ou por paralisia dos gânglios cardíacos parassimpáticos, podendo, paradoxalmente, tornar mais lenta a frequência por paralisia do simpático ou excitação dos gânglios cardíacos parassimpáticos. Altera a frequência cardíaca através da ação sobre os quimiorreceptores dos corpos carotídeo e aórtico e sobre os centros bulbares, gerando modificações da pressão arterial em função dos reflexos compensatórios cardiovasculares secundários. Além das alterações mencionadas no sistema

cardiovascular, a nicotina desencadeia uma descarga de adrenalina da glândula supra-renal, acelerando a frequência cardíaca e a pressão arterial (TAYLOR, 1996).

Da mesma forma, Kwiatkowski et al. (1996) relataram que o hábito de fumar apresenta múltiplos e relevantes efeitos sobre o sistema cardiovascular, promovendo um aumento dos batimentos cardíacos e da resistência periférica dos vasos sanguíneos. Além disso, pode causar aumento da pressão e do fluxo coronariano, bem como diminuição da microcirculação periférica sistêmica. A exemplo do sistema cardiovascular, o sistema nervoso periférico sofre alterações pelo uso da nicotina, inicialmente no estímulo transitório e, posteriormente, em uma depressão persistente dos gânglios autônomos, enquanto as alterações no sistema nervoso central podem produzir tremores e excitação do sistema respiratório.

Além da grande variedade de alterações mencionadas, a nicotina gera liberação de catecolaminas em diversos órgãos isolados, resultando em uma resposta simpaticomimética aumentada e em efeitos alterados na junção neuromuscular.

Um cigarro médio contém de 8 a 9 mg de nicotina e leva 1 mg de nicotina por via sistêmica, sendo que a biodisponibilidade pode se tornar 3 vezes maior, dependendo da intensidade da inalação ou da técnica do fumante (TAYLOR, 1996).

Entre 80% e 90% da nicotina é modificada no corpo, principalmente no fígado, mas também nos rins e pulmões. A meia-vida da nicotina, após inalação ou administração parenteral, é de cerca de 2 horas, sendo que seu principal metabólito é a cotinina e a nicotina-1-N-óxido e a 3-hidroxicotinina, além de outros metabólitos conjugados (TAYLOR, 1996).

A associação entre fumo e o retardo do reparo de feridas é reconhecido na prática clínica pela ação vasoconstritora, que reduz o fluxo sanguíneo nutricional para a pele, resultando em isquemia e prejuízo no reparo tecidual. A vasoconstricção resulta da liberação de catecolaminas adrenais e periféricas que aumentam a pressão e os batimentos cardíacos. Mais do que isso, essas catecolaminas liberadas podem estimular a formação de hormônios (calonas), que solapam o processo de reparo de feridas pela diminuição e retardamento da epitelização. A nicotina também aumenta a adesividade de plaquetas, aumentando o risco da oclusão microvascular pela formação de trombos. Além disso, a proliferação de células vermelhas do sangue, além de fibroblastos e macrófagos, é reduzida pela nicotina. Lento reparo tem sido observado clinicamente em fumantes em situações de trauma, doenças ou pós-operatórios cirúrgicos, particularmente no que se refere ao pacientes submetidos à cirurgia plástica ou reconstrutiva (SILVERSTEIN, 1992; KWIATKOWSKI et al., 1996).

A suspeita dos microcirurgiões de que o tabagismo pode alterar a vitalidade de retalhos livres de vascularização e reimplantes levaram van Adrichem et al. (1996) a realizarem um estudo em ratos para investigar o efeito do fumo sobre esses tipos de cirurgia. Foram realizados retalhos fásquio-cutâneos epigástricos livres de vascularização em 30 ratos, e em outros 30 ratos os retalhos eram pediculados. De cada grupo, 10 ratos eram expostos à inalação da fumaça do cigarro por 6 semanas antes e 2 semanas após a cirurgia, enquanto outros 10 ratos de outro grupo experimental eram da mesma forma expostos, mas por 6 semanas pós-operatórias. O grupo controle era constituído de 10 ratos submetidos apenas à simulação da exposição ao fumo. Também um retalho distal no dorso foi realizado em todos os animais. A monitoração das anastomoses vasculares dos retalhos

epigástricos foi realizada aos 14 dias depois do experimento, através de Laser Doppler para medição de fluxo e termometria, durante o experimento. A vitalidade dos retalhos epigástricos livres de vascularização era significativamente menor em ratos expostos ao fumo. A necrose ou a vitalidade dos retalhos estava estabelecida conforme o desenvolvimento das anastomoses vasculares. A evidência de vitalidade dos retalhos dorsais através do mesmo tipo de análise foi superior para os ratos não expostos ao fumo, e inferior, tanto no pré-operatório como no pós-operatório, para os animais expostos ao fumo.

Baseado em uma amostra de 200 pacientes, dos quais 46 eram fumantes, Sweet e Butler (1979) relacionaram a incidência de alveolite com a frequência do uso e com a fonte utilizada de nicotina (cigarros, cachimbos ou charutos). Através deste trabalho, relacionaram os efeitos do fumo com as alterações clínicas pós-operatórias de exodontias de 3^{os} molares inferiores, cuja conclusão determinou que o hábito de fumar deveria ser abandonado, sobretudo nos 5 dias pós-operatórios, em função da alta incidência de alveolites nos pacientes fumantes.

Através de exames de arteriografia, Mosely e Finseth (1977) demonstraram os efeitos da nicotina na vasoconstrição periférica, retardando o processo de reparo em um paciente fumante crônico portador de ulceração na extremidade do dedo da mão.

Queda de tensão significativa do oxigênio foi observada por Holm e Nachemson (1988) após 30 minutos de inalação de fumaça de cigarro em suínos. Foram analisados fragmentos do disco intervertebral de animais expostos à fumaça de cigarro por um período que variou de 20 a 30 minutos até três horas. Tetraciclina, fluoresceína e radioisótopos marcadores eram injetados por via intravenosa durante

o período de teste com o objetivo de se detectar a concentração dessas substâncias nos discos intervertebrais onde a tensão de O₂ era medida, como indicação da quantidade relativa dos metabólitos em estudo. Foi observada considerável constrição de capilares sangüíneos, sendo que, entre 20 e 30 minutos de exposição à fumaça, ocorreu uma redução de 30% a 40% na difusão de sulfato, oxigênio e metil-glicose, elementos denominados de “parâmetros nutricionais”. Essa difusão, indicativa da eficiência do transporte de metabólitos pelo sangue, chegou a ser reduzida em 50% após 3 horas de exposição, sendo que os registros de recuperação das concentrações próximas do normal ocorreram duas horas após a supressão da exposição à fumaça. Esses resultados apontam para um expressivo prejuízo causado pela nicotina ao sistema circulatório e eventualmente por outras substâncias que compõem o cigarro, manifestado pela redução do calibre vascular e pela diminuição do teor de elementos nutricionais veiculados pelo sangue.

Kaufman et al. (1984) desenvolveram estudo em ratos com o objetivo de avaliar a interferência negativa da inalação do cigarro sobre a vitalidade de retalhos cirúrgicos experimentais. Um retalho distalmente posicionado sobre a região dorsal foi levantado e novamente reposicionado em cada animal. A avaliação dos retalhos no 8º dia pós-operatório mostrou uma taxa de necrose de 28,5% em 25 animais controle, 32,2% em 21 ratos expostos à inalação do fumo por 7 dias pós-operatórios, 41,3% em 18 ratos expostos à inalação do fumo por 7 dias pré-operatórios, e 45,7% em 21 ratos expostos à inalação do fumo por 7 dias antes e 7 dias depois do procedimento cirúrgico. Os cortes histológicos dos pulmões dos ratos expostos ao cigarro revelaram um padrão compatível com injúrias em fumantes moderados.

Não obstante os efeitos negativos sistêmicos do cigarro ao indivíduo, a relação quantidade/tempo necessária para se ter um efeito deletério ainda não está esclarecida, tanto em relação à saúde dos diferentes órgãos conhecidamente afetados, como às respostas teciduais locais de reparação, devido à grande diversidade de respostas apresentadas por diferentes indivíduos.

Raulin et al. (1988) foram um dos pioneiros na pesquisa *in vitro* focando a importância dos efeitos biológicos do fumo no periodonto, sobretudo na aderência de fibroblastos provenientes de fetos humanos sobre anteparos de vidro e dentina radicular. A incubação das células foi feita nas concentrações 0 (controle), 25, 50, 100, 200 e 400 mg/ml de nicotina por períodos de 24, 48 e 72 horas. As análises em microscopia óptica e eletrônica de varredura revelaram que, no grupo controle, os fibroblastos encontravam-se firmemente aderidos às superfícies radiculares com formato achatado e dispostos paralelamente à superfície radicular. Nos grupos experimentais, as células apresentavam alteração no padrão de aderência, elevada presença de vacúolos citoplasmáticos e disposição desordenada dos fibroblastos em relação à superfície radicular. Os resultados nos grupos testes foram proporcionais à concentração e tempo de exposição à nicotina.

Forrest et al. (1991), por meio de um estudo em ratos, investigaram os efeitos a longo prazo do tratamento com baixas doses de nicotina sobre a hemodinâmica da pele e sobre a viabilidade e morfologia microvascular em retalhos de pele de 4 x 10 cm no dorso de ratos. Além disso, analisaram a reversibilidade dos efeitos deletérios induzidos pela nicotina sobre a viabilidade dos retalhos depois da cessação do tratamento com nicotina. As baixas doses de nicotina (0,6 mg/kg), administradas duas vezes ao dia no subcutâneo dos ratos por 24 semanas, diminuíram significativamente o fluxo sanguíneo capilar dos retalhos e

área de viabilidade de pele quando comparados com os controles tratados com solução salina (n=15). No entanto, os mesmos parâmetros analisados em ratos (n=15) que tiveram o tratamento com nicotina interrompido duas semanas antes dos procedimentos cirúrgicos, eram praticamente iguais aos controles, indicando que os efeitos deletérios causados pela nicotina, em baixas dosagens e a longo prazo, foram reversíveis.

Diante desses relatos, torna-se sustentada a suspeita entre cirurgiões de que pacientes fumantes apresentam problemas no processo de reparo. Embora o papel do tabaco na etiologia da doença periodontal não esteja suficientemente claro, muitos autores e profissionais da odontologia acreditam que o hábito de fumar apresenta forte relação com a etiologia, aumento da incidência e severidade da doença periodontal (PEACOCK et al., 1993). Mais do que isso, sabe-se que a reprodução e adesão de fibroblastos são de primordial importância no restabelecimento do tecido conjuntivo após a terapia periodontal cirúrgica e não cirúrgica, eventos que podem estar comprometidos pelo consumo de tabaco de acordo com modelos de estudo *in vitro* e *in vivo* em animais e em humanos.

O tabagismo é provavelmente o mais importante e controlável fator de risco para as periodontites. Ele resulta em alterações vasculares, inflamatórias e imunes no processo de reparo. Em estudo prévio, Palmer et al. (1999) relataram níveis elevados de moléculas de adesão solúveis no soro (sICAM-1) em fumantes, independentemente da situação periodontal. Moléculas de adesão-1 têm sido consideradas marcadores de risco para a doença cardiovascular.

Os autores relataram os efeitos a curto prazo da utilização dos cigarros sobre o fluxo sanguíneo e níveis de moléculas de adesão-1. Voluntários humanos incluíam não fumantes, fumantes moderados e fumantes pesados. O fluxo

sangüíneo foi monitorado na gengiva e na pele da testa dos indivíduos utilizando-se um “Laser Doppler Flowmeter” e os níveis sICAM-1, cotinina e nicotina medidos antes, durante e depois de 60 minutos de um episódio de utilização do cigarro. Não houve evidência que suporte a teoria de que existe vasoconstrição nos tecidos gengivais. Por outro lado, houve significativo aumento do fluxo sangüíneo da pele da testa de fumantes moderados, o que não era notado em não fumantes controles e fumantes pesados, sugerindo uma tolerância a longo prazo neste último grupo. Os níveis de sICAM-1 permaneceram sem modificações durante este episódio, sugerindo efeito a longo prazo. Em um grupo paralelo, ficou demonstrada a direta e significativa correlação entre sICAM-1 e níveis de cotinina no soro, observação que pode ser relevante nos mecanismos etiológicos das periodontites como também em outras doenças associadas ao fumo.

Nociti et al. (2002b) investigaram a influência da nicotina na densidade óssea em torno de implantes realizados em tibia de coelhos. Foram inseridos um total de 128 implantes de 7 mm de comprimento e 3,75 mm de diâmetro divididos em 2 grupos de 64 animais. No grupo 1, 64 implantes foram tratados com óxido de alumínio e, no grupo 2, foram utilizados 64 implantes com superfícies lisas. Os animais foram submetidos a aplicações subcutâneas diárias de nicotina e divididos em subgrupos de 1 a 4. Depois de 42 dias, os animais foram sacrificados e blocos ósseos contendo os implantes foram removidos e preparados para a inclusão em parafina. A densidade óssea foi medida na superfície de contato osso implante e as análises estatísticas não revelaram diferenças significantes com relação ao efeito da nicotina ou desenho de superfície sobre a densidade óssea ao redor dos implantes.

Nociti et al. (2002a) também concluíram, em outro estudo em ratos, que a inalação intermitente de cigarros pode resultar em pobre qualidade óssea ao redor de implantes de titânio. Foram utilizados 40 ratos machos pesando entre 300 e 440 g submetidos à instalação de implantes de 4 mm de comprimento e 2,2 mm de diâmetro colocados bilateralmente nas tíbias. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos 1 e 2, com 20 animais em cada um. O grupo 1 foi utilizado como controle e, no grupo 2 (experimental), os animais foram mantidos em câmaras especiais para inalação intermitente de cigarro por 8 minutos, 3 vezes ao dia, após a realização dos procedimentos cirúrgicos até o sacrifício, aos 60 dias de experimento. Na avaliação das superfícies de contato e áreas ósseas de inserção dos implantes nos ossos cortical e esponjoso, uma pequena diferença nas superfícies de contato dos implantes foi notada, embora não estatisticamente significativa entre ambos os grupos. No entanto, a inserção dos implantes estava consideravelmente diminuída tanto nas áreas corticais quanto nas de tecido ósseo esponjoso no grupo experimental ($84,73\% \pm 4,77$ contra $79,85\% \pm 6,17$ para as áreas de osso cortical e $32,01\% \pm 6,62$ contra $20,71\% \pm 8,57$ para áreas de osso esponjoso, respectivamente nos grupos 1 e 2).

Martinez (2002), em um estudo *in vitro*, investigou a morfologia, densidade e viabilidade de fibroblastos em superfícies dentais condicionadas com nicotina e cotinina, principal subproduto da nicotina, cuja meia vida biológica pode variar entre 10 e 30 horas no plasma. Os resultados deste estudo revelaram o efeito citotóxico da nicotina, representado por alterações na morfologia celular nas concentrações de 100 µg/ml e 1 mg/ml de nicotina utilizada no condicionamento radicular. Além disso, reduziu a proliferação celular representada pela densidade das células, de forma proporcional à dose. O grupo condicionado pela cotinina só

apresentou efeitos citotóxicos, alterando morfologia e densidade celular na concentração de 1 µg/ml, maior concentração testada. A nicotina alterou *in vitro* a viabilidade de fibroblastos de forma proporcional à dose e ao tempo de condicionamento; enquanto apenas as maiores concentrações de cotinina (500 ng/ml e 1 µg/ml) resultaram em discreta redução da viabilidade celular. Esse estudo demonstrou também que a raspagem mecânica das superfícies radiculares condicionadas pela nicotina nas concentrações de 100 ng/ml e 1 µg/ml reduziu os efeitos nocivos induzidos pela droga, o que também ocorreu nas superfícies radiculares condicionadas pela cotinina na concentração 1 µg/ml.

Recentes estudos apontam o estresse, ao lado da *diabetes mellitus* e do hábito de fumar, como importantes fatores de risco para a doença periodontal. A associação dos efeitos do estresse aos da nicotina foi investigada por Benatti et al. (2003), através de um estudo no qual os autores demonstraram que o estresse, isoladamente, não afetou a doença periodontal em ratos, mas aumentou significativamente os efeitos da nicotina sobre a doença periodontal. Foram utilizados 20 ratos Wistar, fêmeas, nos quais a doença periodontal foi induzida através de ligaduras no interior do sulco gengival. Quatro grupos foram estabelecidos como se segue: Grupo A, composto por animais submetidos à aplicação de solução salina; Grupo B, composto por animais submetidos a injeções intraperitoneais de 0,73 mg de nicotina/kg/dia; Grupo C, composto por animais imobilizados durante duas horas/dia por 40 dias em associação à aplicação de solução salina e, por fim, o Grupo D, composto de animais submetidos ao estresse da imobilização de 2 horas ao dia, por 40 dias, e injeções intraperitoneais de nicotina da mesma forma do grupo B. Os animais, depois de sacrificados, aos 40 dias do experimento, foram preparados para análise intergrupo com os seguintes resultados: grandes perdas

ósseas nos animais do grupo D comparados com os espécimes dos grupos A, B e C. Além disso, os dados revelaram um significativo efeito da nicotina (Grupo B) comparado aos grupos A e C ($p < 0,05$) e nenhuma diferença entre os grupos.

César Neto et al. (2003) fizeram um estudo comparativo sobre o efeito da administração da nicotina e inalação da fumaça do cigarro sobre o reparo ósseo em implantes de titânio. Para tanto, foram utilizados 45 ratos Wistar, pesando entre 300 e 400 g, que receberam implantes de titânio de 4 mm de comprimento por 2,2 mm de diâmetro, bicorticais, introduzidos totalmente em suas tíbias. Depois de realizados os procedimentos cirúrgicos, os animais foram distribuídos em 3 grupos como se segue. O grupo 1 ($n=19$) foi utilizado como controle e não sofreu nenhum tipo de tratamento. Os animais do grupo 2 ($n=15$) foram mantidos em câmaras especiais de acrílico de 45 x 25 x 20 cm³, com bombas de ar e tubos de entrada e saída. Cada câmara continha 5 animais, a fim de serem submetidos à inalação intermitente da fumaça de 10 cigarros contendo 1, 3 mg de nicotina cada um, bombeada para dentro da câmara por oito minutos, três vezes ao dia. No grupo 3 ($n=11$), foram aplicadas 2 doses diárias de nicotina de 3 mg/kg, 2 vezes ao dia. Os animais teste foram submetidos aos respectivos tratamentos até sacrifício, aos 60 dias. Observações clínicas importantes foram descritas, como a morte de um animal do grupo 1, cinco do grupo 2 (3 durante os 2 primeiros dias de inalação e 2 durante coleta de sangue) e 4 do grupo 3, também durante a coleta sangüínea. Todos os animais sobreviventes do grupo 2 apresentavam dificuldades respiratórias, além de insignificante perda de peso para os grupos 2 e 3. Foram analisadas, histologicamente, a superfície de contato e nível de inserção dos implantes dentro das áreas fresadas tanto em osso cortical como em osso esponjoso. Com relação ao osso cortical, tanto a superfície de contato como a altura óssea sofreram significante

interferência negativa nos animais do grupo 2 enquanto nos animais do grupo 3 esses parâmetros não estavam alterados. Nas áreas de osso esponjoso, o grupo 2 resultou em porcentagem diminuída de superfície de contato quando comparado ao grupo controle. Além disso, a altura de inserção dos implantes estava significativamente diminuída para os grupos 2 e 3 em comparação ao grupo controle. Além de demonstrar que a nicotina alterou significativamente os parâmetros analisados, outras moléculas associadas à composição química do cigarro podem potencializar os efeitos negativos do mesmo.

Martins et al. (2004), com o propósito de avaliar o impacto do hábito de fumar sobre os resultados clínicos do recobrimento radicular seguido de enxerto de tecido conjuntivo sub-epitelial, trataram dezoito defeitos em quinze pacientes (sete fumantes e 8 não fumantes), em caninos e pré-molares, apresentando recessões classes I e II de Miller. As medidas clínicas, além das iniciais, foram obtidas aos 30, 60, 90 e 120 dias depois da cirurgia. Essas medidas clínicas incluíam índices de placa e gengival, recessão gengival, profundidade de sondagem, níveis de inserção, espessura gengival e faixa de tecido queratinizado. As análises intragrupos mostraram que o enxerto conjuntivo subepitelial é capaz de promover o recobrimento radicular, aumento da espessura gengival e melhora do nível de inserção clínica em ambos os grupos ($p < 0,05$). Por outro lado, análises intergrupos demonstraram que fumantes apresentaram uma baixa porcentagem de recobrimento radicular ($58,84\% \pm 13,68\%$ contra $74,73\% \pm 14,72\%$), menor ganho de inserção clínica ($2,54 \pm 0,79$ mm contra $2,00 \pm 1,04$ mm) e maior profundidade de sondagem ($1,56 \pm 0,53$ mm contra $2,35 \pm 0,67$ mm) em relação aos não fumantes ($p < 0,05$). Mais do que isso, 12 dias depois dos enxertos, fumantes apresentaram mais tecido queratinizado comparado a não fumantes ($3,30 \pm 0,86$ mm contra $4,50 \pm 1,16$ mm)

($p < 0.05$). Portanto, o consumo de cigarros pode apresentar impacto negativo nos resultados do recobrimento radicular após procedimentos de enxerto de tecido conjuntivo subepitelial, tornando-se um desafio a mais para a cirurgia plástica periodontal.

Saldanha et al. (2004) realizaram estudo em cães objetivando investigar o impacto da nicotina no reparo de defeitos ósseos através da regeneração óssea guiada. Foram criados defeitos ósseos bilaterais em 16 cães Mongrel (aproximadamente 15 kg), os quais foram tratados pelo uso de uma membrana de politetrafluoretileno expandido de um lado, enquanto que o outro foi mantido como controle, sem uso de membrana. Os defeitos foram realizados 3 meses após a extração dos 1^{os}, 2^{os} e 3^{os} molares bilateralmente e mediam aproximadamente 8 mm no sentido ápico-coronal e vestibulo-lingual e 12 mm no sentido méso-distal. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: Grupo 1, placebo (8 animais) e grupo 2, onde os animais foram tratados com nicotina subcutânea (2mg/kg), 2 vezes ao dia (8 animais). Os animais foram sacrificados 4 meses depois do tratamento cirúrgico e, uma vez processadas as peças, os parâmetros analisados foram: altura óssea, faixa de osso, densidade óssea e área de novo osso formado. As análises intergrupos mostraram que, nos defeitos protegidos pela membrana no grupo placebo, havia um aumento da área óssea quando comparado aos cães que receberam o mesmo tipo de tratamento no grupo tratado com nicotina e também aos defeitos não submetidos à regeneração óssea guiada, independentemente do uso da nicotina ($p < 0,05$). Além disso, a administração de nicotina afetou a densidade óssea em ambos os tipos de tratamento ($p < 0,05$).

Papantonopoulos (2004) comparou, por parâmetros clínicos e radiográficos, pacientes fumantes e não fumantes submetidos a tratamento de periodontite avançada que receberam terapia de manutenção por, no mínimo, 5 anos. Foram selecionados 29 pacientes com perda de suporte ósseo inicial de 50% em metade dos dentes. Todos os pacientes foram submetidos à terapia periodontal não cirúrgica ou cirúrgica, conforme requereu cada caso. Quatorze pacientes eram fumantes ativos durante o período de manutenção. O controle foi realizado através de medidas clínicas de profundidade de sondagem, presença de placa e gengivite além de novas tomadas radiográficas padronizadas. Não fumantes e fumantes não foram significativamente diferentes em relação à idade, tempo de manutenção da terapia, número de dentes envolvidos, média de perda óssea radiográfica inicial e final, bem como nas porcentagens de bolsa entre 4 e 5mm e ≥ 6 mm. Um dente em um não fumante e 3 dentes de 2 fumantes foram perdidos durante o período de manutenção. Sete sítios em 4 não fumantes e 11 sítios em 6 fumantes tiveram perdas ósseas radiográficas ≥ 2 mm. O presente estudo não mostrou diferenças significativas entre ambos os grupos nos parâmetros clínicos de sondagem e medidas de perdas ósseas radiográficas.

De acordo com Persson et al. (2003), a considerável interferência negativa do tabagismo nos resultados da terapia periodontal pode estar relacionada a uma atividade neutrofílica comprometida na expressão da elastase e/ou metaloproteinase da matriz-8 (MMP-8), bem como na atividade de inibidores da protease alfa-1 antitripsina (α -1-AT) e alfa -2 macroglobulina (α -2-MG).

Os autores realizaram um estudo em humanos objetivando esclarecer o efeito do uso do tabaco sobre o nível dessas substâncias no fluido gengival seguido de tratamento cirúrgico. Para tanto, utilizou uma população de 15

indivíduos fumantes e 15 não fumantes com doença periodontal de moderada a severa, submetidos a tratamento cirúrgico. A média de idade dos fumantes era de 52 anos, enquanto dos não fumantes era de 57 anos, portanto a média das idades era estatisticamente diferente. Os fumantes consumiam entre 10 e 20 cigarros por dia (média de 12,5) e o tempo de duração do consumo variou entre 16 e 43 anos (média de 30 anos). Nenhum dos indivíduos do grupo dos não fumantes havia fumado anteriormente ou abandonaram o hábito pelo menos 10 anos antes da pesquisa e não se expuseram ao uso de outra forma de tabaco. Três indivíduos do grupo de fumantes relataram história médica de hipertensão ou bronquite, enquanto os outros 12 relatavam quadro satisfatório de saúde geral. Dos indivíduos não fumantes, 6 relataram boa saúde, enquanto os outros 9 tinham história de uma ou mais doenças sistêmicas. Os pacientes apresentavam quadro de periodontite de moderada a severa evidenciada por múltiplos sítios com profundidade de sondagem ≥ 5 mm. O total de sítios com profundidade de sondagem ≥ 6 mm e o total de sítios doentes era significativamente maior nos indivíduos fumantes. Na área a ser tratada, três dos sítios com maior profundidade foram selecionados para amostras de fluido gengival. A média de profundidade de sondagem dos três sítios não foi significativamente diferente entre fumantes e não fumantes. Similarmente, não houve diferença significativa entre os grupos quanto à proporção de sítios com sangramento. Antes do tratamento cirúrgico periodontal, todos os pacientes foram submetidos à raspagem e alisamento radicular. A cirurgia foi realizada depois de um período de manutenção, de 18 a 24 meses, utilizando-se a técnica de retalho de Widman modificado com recontorno ósseo, quando necessário. Foram prescritos aos pacientes bochechos com clorexidina 2 mg/ml, duas vezes ao dia, por 4 semanas depois da cirurgia. Medidas clínicas e amostras de fluido gengival foram colhidas no

início, imediatamente após o tratamento cirúrgico e na 1^a e na 5^a semana depois do tratamento. Cinco semanas foram adotadas como o tempo ideal para observação porque era necessário um período bem além do tempo inicial da fase aguda do processo de reparo. Profundidade de sondagem e sangramento gengival foram medidos no início, ao passo que o acúmulo de placa foi medido em cada tempo de observação. Medidas clínicas de profundidade de sondagem, sangramento gengival e acúmulo de placa foram feitos nos três sítios com áreas tratadas cirurgicamente. Os resultados mostraram níveis inalterados de α -1-AT, α -2-MG em fumantes submetidos à cirurgia. Em não fumantes, os níveis de α -1-AT e α -2-MG estavam aumentados, ao passo que níveis de MMP-8 diminuíram. Os níveis de elastase permaneceram inalterados em ambos os grupos. Esses resultados indicam que, no tabagismo, os níveis de α -1-AT, α -2-MG e MMP-8, inalterados durante o período de recuperação seguido do tratamento cirúrgico, podem ser interpretados como uma possível interferência do fumo na resposta ao tratamento e podem, em parte, explicar a evidência clínica de um resultado inferior na terapia em fumantes.

2.2. AÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE O PROCESSO DE REPARO EM FERIDAS CIRÚRGICAS.

A aplicação dos lasers de baixa potência nos processos de reparo tem sido objeto de pesquisa para diversos autores. Muitos modelos experimentais já foram utilizados com o objetivo de esclarecer sua efetividade em situações de trauma produzido pelo procedimento cirúrgico. Embora exista uma grande variedade de protocolos para aplicação dos lasers de baixa potência, os parâmetros referentes às variáveis físicas, como comprimento de onda, tempo de

exposição, densidade e energia, parecem representar o foco mais importante na discussão sobre a otimização deste recurso no reparo de feridas, sobretudo cutâneas.

Muitos autores demonstraram interesse, através de pesquisa e publicações, no entendimento dos fenômenos biológicos que ocorrem no processo de reparo e na modulação desses eventos pela utilização dos lasers de baixa potência (ANNEROTH et al., 1988; CONLAN et al., 1996; HUNTER et al., 1984; KANA et al., 1981; LYONS et al., 1987; MESTER, 1973; MESTER et al., 1971, 1976).

Mester et al. (1971) estudaram o reparo de feridas induzidas mecanicamente e outras por queimaduras de terceiro grau provocadas na região dorsal de ratos. Essas lesões foram submetidas à ação do laser de rubi com comprimento de onda de 694,3 nm e doses de 0,5 a 10 J/cm². O número de aplicações foi de 1, 2 e 3 em um período de 14 dias. Os resultados comprovaram que a exposição à radiação laser de baixa intensidade estimulou o processo de reparação em feridas por queimaduras de terceiro grau induzidas pela eletrocoagulação da ferida, sobretudo na dose de 1 J/cm². Os resultados demonstraram também que a repetição das doses estimulou o grau de cicatrização por granulação das feridas induzidas por queimaduras.

Kana et al. (1981), através de métodos descritivos, histológicos e morfológicos relacionaram a relação do laser de baixa potência com cicatrização de feridas em ratos. Para tanto, utilizaram o laser de He-Ne, de 632,8 nm, 25 mW de potência e laser de Argônio de 514,5 nm de comprimento de onda. As aplicações foram feitas diariamente durante 17 dias, com densidade energética variando entre 4, 10 e 20 J/cm². Os resultados foram obtidos através de

observações clínicas e fotográficas, além da dosagem de hidroxiprolina do tecido cicatricial determinada no 18º dia de pós-operatório. Os resultados demonstraram que a radiação de He-Ne e Argônio provocaram efeito estimulante sobre a síntese de colágeno, cujo melhor resultado se deu com a aplicação de 4 J/cm² de energia. O período de aplicação em que ocorreram os melhores resultados foi entre 3 e 12 dias. Os resultados considerados positivos consistiam em um fechamento mais rápido da ferida com elevada epitelização da área tratada. Esses resultados eram mais evidentes nas feridas tratadas com He-Ne. Quando submetidas a 20 J/cm² de potência, as feridas demonstravam ligeiro retardo do processo de reparação. No entanto, em nenhuma ferida tratada com laser houve inibição da síntese de colágeno. O laser de Argônio estimulou a síntese de colágeno inclusive nas feridas contra-laterais que não foram irradiadas, o que não ocorreu com laser de He-Ne. Os autores suspeitam que essa observação ocorreu em função do efeito fotobiológico inerente ao comprimento de onda do laser.

Kami et al. (1985) investigaram o efeito da irradiação do laser de baixa energia na vitalidade de retalhos experimentais na pele de ratos. Foi utilizado um laser diodo de Arseneto de Gálio e Alumínio, desenvolvido pela "Japan Medical Laser Laboratory". A potência utilizada foi de 1,5 mW e o comprimento de onda de 830 nm. As irradiações foram feitas antes ou depois da elevação dos retalhos em dois grupos de 20 ratos cada um. Um terceiro grupo de 20 animais foi utilizado como controle. As lesões consistiram de retalhos com 3 x 9 cm na pele da região caudal de cada rato.

A terapia a laser foi realizada nos 5 dias consecutivos por 6 minutos em cada animal no pré-operatório para um grupo (n=20) e no pós-operatório para

o outro grupo teste (n=20). No sétimo dia pós-operatório, as áreas vitais dos retalhos foram medidas e comparadas. Em ambos os grupos que receberam tratamento com irradiação com laser de Arseneto de Gálio e Alumínio de baixa energia, as áreas vitais de retalho estavam aumentadas consideravelmente, provavelmente devido à proliferação de vasos sanguíneos e aumento do fluxo, observados em torno dos pontos de irradiação.

Com o objetivo de avaliar os efeitos da bioestimulação no reparo de feridas através do laser He-Ne, Lyons et al. (1987) desenvolveram estudo em que analisaram os efeitos do laser de baixa energia sobre a síntese do colágeno pelos fibroblastos humanos e relataram um aumento da síntese de colágeno *in vitro*. Para analisar o efeito do laser de baixa energia na síntese de colágeno *in vivo*, realizaram feridas experimentais em ratos que, uma vez suturadas, foram submetidas à irradiação do laser de He-Ne com potência de 1,56 mW e fluência de 1,22 J/cm². As feridas foram submetidas à irradiação do laser em dias alternados por 2 meses enquanto as feridas controles permaneceram sem tratamento. Os espécimes foram então analisados histologicamente e os resultados mostraram um aumento considerável na contração das feridas irradiadas na primeira e na segunda semana. Além disso, o conteúdo colágeno foi significativamente aumentado nos dois meses quando comparados aos controles, sugerindo um efeito benéfico do He-Ne sobre o reparo de feridas *in vivo*.

Soares et al. (1989), por meio dos mesmos métodos, avaliaram a reparação tecidual em feridas cutâneas de ratos após irradiação com laser de Hélio-Neônio (He-Ne). Foram utilizados 18 animais divididos em 3 grupos de 6, onde cada animal foi submetido a duas tricotomias e duas lesões no dorso de

aproximadamente 1 cm de diâmetro, uma mais próxima ao crânio e outra em direção à cauda. As doses diárias aplicadas eram de $2,7 \text{ J/cm}^2$ por 10 minutos.

As feridas foram analisadas sob os aspectos morfológicos e histométricos no 7º, 14º e 21º dias do experimento, sendo que as aplicações do laser foram feitas entre os dias 0 e 4 para o grupo de 7 dias; 0 e 4 e 7 e 11 dias para o grupo de 14 dias e 0 e 4, 7 e 11 e 14 e 18 dias para o grupo analisado aos 21 dias. Os resultados obtidos mostraram epitelização e contração precoces nas feridas irradiadas. A proporção de fibras colágenas foi maior nas feridas irradiadas nas 3 fases analisadas do experimento. A quantidade de fibroblastos foi maior no grupo irradiado apenas no 7º dia pós-procedimento cirúrgico. Os autores concluíram que o processo de reparo evoluiu de forma mais acelerada nas feridas do grupo teste em comparação ao controle.

Garcia (1992) realizou estudo clínico, biométrico e histológico em feridas cutâneas submetidas à ação da radiação laser (904 nm). Foram empregados nesta pesquisa 36 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) machos, com pesos variando entre 160 e 220 g. Os animais foram divididos em 3 grupos de 12 animais, os quais foram submetidos a duas lesões circulares bilaterais de aproximadamente 8 mm no dorso de cada animal. Estabeleceu-se que as lesões do lado direito de cada animal seriam experimentais com aplicação da laserterapia e as contra-laterais seriam controle. Foram utilizados semicondutores de Arsênio e Gálio com emissão infravermelho e pulsátil e comprimento de onda de 904 nm. A aplicação foi pontual em 8 localizações distintas na periferia da lesão e uma central para que toda lesão fosse tratada. A frequência de repetição aplicada variou entre 500 Hz (mínima) e 3,700 Hz (máxima), com potência média de saída entre 0,3 e 3,5 mW. No grupo I, as

feridas experimentais foram submetidas à freqüência de pulso de 1,300 Hz e 1,25 mW de potência, o que determinou 19 segundos por ponto de exposição. No grupo II, a freqüência de pulso foi de 2,100 Hz e 2,00 mW de potência, perfazendo 12 segundos por ponto de exposição. No grupo III, a freqüência de pulso utilizada foi de 2,900 Hz e 2,75 mW de potência, o que determinou, por ponto de aplicação, 9 segundos de exposição. Os tempos de sacrifício dos animais ocorreram aos 3, 7 e 14 dias do procedimento cirúrgico e pós-aplicação do laser. Observou-se que, sob os pontos-de-vista clínico, biométrico e histológico, as feridas tratadas com laser demonstraram processos de reparação bem diferenciados, caracterizados por reparo mais precoce clinicamente. A contração também era maior nas feridas experimentais. Histologicamente, o processo de reparação apresentou-se mais acelerado, caracterizado pela velocidade de epitelização das feridas. Sob os pontos-de-vista clínico, biométrico e histológico, os resultados foram mais significativos para o tempo de 3 dias e para o grupo II. As lesões experimentais e controles estavam, sob todos os aspectos, completamente reparadas aos 14 dias, sem evidências de efeitos indesejáveis do raio laser.

Os mecanismos de ação do laser de baixa potência foram propostos por Iijima et al. (1993) e revelaram que o laser de He-Ne, com 632,8 nm de comprimento de onda e 8,5 mW de potência, afetou a estabilidade da membrana celular dos eritrócitos em humanos. Eles relataram o efeito protetor do laser que reduziu a hemólise de células vermelhas do sangue. Consideraram também que a bioestimulação de proteínas do citoesqueleto permite conformação mais estável das camadas de lipídeos e proteínas.

De acordo com Yu et al. (1994), as irradiações lasers de baixa intensidade podem provocar efeito modulador sobre as células na produção de fatores de crescimento. Sugeriram que a bioestimulação do laser pode causar a liberação de fator de crescimento derivado de plaquetas dos fibroblastos. Utilizaram laser de Argônio com comprimento de onda de 630, 640, 650 e 660 nm por 4 a 8 minutos. As citocinas liberadas pelas culturas celulares foram medidas pelo método ELISA e observou-se diferença significativa em relação aos controles.

Muitas citações sugerem que a bioestimulação tem seu maior efeito estabelecido na fase proliferativa do processo cicatricial. No entanto, em animais em que a pele é firmemente aderida às fáscias subjacentes, o reparo das feridas parece não sofrer interferência no processo cicatricial. Apontam também para a falta de estudos controlados em humanos, onde as pesquisas baseiam-se praticamente nas investigações clínicas, o que diminui a confiabilidade na utilização desses dispositivos, e, além disso, indicam a necessidade de pesquisas *in vivo* em modelos de maior similaridade com humanos (CONLAM et al., 1996).

Bisht et al. (1994) investigaram a influência do laser de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. As feridas testes do lado esquerdo dos animais foram submetidas à radiação com laser de Hélio-Neônio a 4 J/cm^2 por 5 minutos, enquanto as feridas contra-laterais foram utilizadas como controle. A média de tempo de fechamento das feridas controle foi de $14,1 \pm 0,86$ (12 a 15 dias) enquanto a das feridas teste foi de $10,3 \pm 0,68$ (9 a 12 dias). O tecido de granulação no grupo teste era significativamente maior do que no grupo controle. O critério para o fechamento das lesões foi escolhido arbitrariamente e

consistiu no exame visual. As análises histopatológicas das feridas foram feitas através de biópsias colhidas nos dias 3, 5, 7, 9, 12, 15 e 17 do experimento com 5 espécimes em cada tempo, com exceção do grupo de 17 dias, composto por 8 amostras. Epitelização, atividade de fibroblastos, aumento da hidroxiprolina e, portanto, da colagenização, infiltração leucocitária e neovascularização foram eventos do processo de cicatrização relatados pelos autores como mais favoráveis e precoces nos grupos testes do que no controle. Apesar de morfologicamente idênticas no 17º dia, a quantidade de colágeno, medido pelos níveis de hidroxiprolina, era substancialmente maior nas feridas tratadas com laser que no grupo controle. A epitelização no grupo teste estava completa no 9º dia do experimento, sendo, portanto, sugerido pelos autores como fator determinante na velocidade e quantidade de colágeno no grupo teste ao final do processo cicatricial. Concluíram os autores que, pelo efeito bioestimulatório, da baixa dosagem, o laser pode ser recomendado para tratamento de lesões na pele com o objetivo de se conseguir cicatrização através de tecido diferenciado precocemente.

Neiburger (1995), através de três estudos preliminares, analisou a efetividade da fotobioestimulação, as possíveis modificações nos níveis de temperatura eventualmente ocasionada pelo laser, bem como descreveu o controle de um caso clínico de paciente que apresentava 3 estomatites traumáticas de mesma origem no lábio, com forma, tamanho e profundidades muito semelhantes. Uma das lesões foi utilizada como controle enquanto para as outras duas, variou-se o tipo de laser conforme a proposição. A alteração de temperatura foi analisada através de um termostato de 3 mm (Oslen Eletronic, Chicago) conectado a um registrador digital em unidade de resistência (ohm).

Uma lâmpada controle de 60 W colocada a 10 cm do sensor por 5 segundos resultou em uma alteração na unidade de resistência de 10 ohms, o que corresponde a 3°C. O sensor não registrou nenhuma alteração na temperatura quando os lasers foram aplicados, demonstrando assim que não há alteração da temperatura na utilização desses emissores.

A efetividade da bioestimulação foi analisada através de um modelo experimental em ratos (NEIBURGER, 1995) Os animais, todos adultos, foram submetidos a 4 feridas idênticas na metade distal de suas caudas. As lesões foram produzidas através de uma borda soldada de ferro com 25 W de potência a uma temperatura de 237°C sobre a pele, com 8 g de força por um segundo. As lesões produzidas eram de 3 mm de diâmetro e de coloração branca, contrastando com a pigmentação escura da cauda dos animais. A cada lesão foi designada uma letra: A, B, C e D. A lesão A recebeu uma exposição de 30 segundos de laser de He-Ne com potência de 6,1 mW a 10 cm de distância do feixe para a área operada e diâmetro do feixe de 1,5 mm. A dose total foi de 10,3 J/cm². A lesão B não foi irradiada e serviu como controle. A lesão C foi irradiada por 30 segundos com laser de diodo de 5,0 mWs de potência na dose de 2,1 J/cm². A lesão D foi irradiada com o mesmo tipo de laser da lesão C, mas por duas vezes, portanto, com tempo total de 1 minuto e densidade de energia de 4,2 J/cm². As aplicações foram feitas dentro de poucos minutos após a realização das feridas. As feridas foram medidas e ranquiadas em uma escala de 1 a 4, onde 1 era o reparo mais lento e 4 o processo de reparo mais adiantado. As feridas foram examinadas diariamente na primeira semana e depois em intervalos a cada 2 dias. Nos grupos A, C e D, o reparo era melhor nos primeiros

pós-operatórios em comparação ao grupo controle. O tecido irradiado era menos inflamado e com edema reduzido.

Esses estudos preliminares, longe de definitivos, parecem indicar que o laser de He-Ne com comprimento de onda entre 632 nm e 694 nm e níveis de densidade de energia de 2,0 a 24 J/cm² acelera o reparo das lesões de pele em animais e humanos. Salientam que, considerando a disponibilidade, baixo custo, segurança e facilidade de uso do laser de He-Ne, estudos otimizando a dosagem e frequência poderiam auxiliar na estandarização dos procedimentos.

Conlan et al. (1996) realizaram uma revisão da literatura sobre os princípios básicos da bioestimulação em vários tipos de lasers de baixa potência, mostrando os mecanismos de ação da bioestimulação, bem como os efeitos dos lasers sobre a proliferação celular, síntese do colágeno e reparo de feridas em modelos animais e humanos. Os resultados obtidos desta revisão apontam para um número controlado de estudos, cujas respectivas metodologias de lesões em pele de animais revelam que a bioestimulação, provocada pelo laser, proporciona um reparo mais rápido e melhora forças de tensão no processo de reparo. Os aspectos mais relevantes do processo cicatricial são: proliferação de fibroblastos, síntese do colágeno, estimulação da fagocitose e uma razão aumentada na produção de matriz extracelular. Essas observações são asseguradas em sua maioria por investigações *in vitro*, o que não é observado com consistência, tão pouco encontrado com frequência nos estudos *in vivo*. O mecanismo de ação não é totalmente esclarecido, mas possíveis explicações incluem a estimulação do ácido ascórbico retomado pelas células, estimulação de fotoreceptores pelas mitocôndrias respiratórias, modificações no ATP celular e estabilização da membrana celular.

Hall et al. (1994) investigaram o processo de cicatrização em feridas na área caudal de ratos com a utilização do laser de baixa energia. Os animais foram divididos em 3 grupos, nos quais foram realizadas duas feridas em cada animal na região caudal. Os grupos A e B, com 19 animais cada, foram tratados como se segue. O grupo A recebeu irradiação com laser de um lado e a ferida contra - lateral foi mantida como controle. O grupo B recebeu irradiação placebo de um lado e o lado contra - lateral foi mantido como controle. Dois animais de cada grupo foram sacrificados a cada dia por 3 dias. Ao exame clínico e histológico, não foi observada qualquer diferença entre os grupos durante o período analisado. Este estudo não confirmou que o tratamento com laser de baixa energia pode influenciar o processo de reparação.

Locci Jr.(2002) investigou o efeito da associação de dois comprimentos de onda de emissores de lasers em baixa intensidade (685 e 780 nm) sobre os eventos da reparação tecidual em feridas cutâneas em dorso de ratos. Para tanto, utilizaram 72 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) machos com peso médio variando entre 160 e 220 gramas. As lesões foram realizadas através de um “punch” de aproximadamente 8 mm de diâmetro no dorso dos animais. Os animais foram divididos em 3 grupos de 24 espécimes, que receberam o seguinte tratamento: Grupo I (controle), onde não houve tratamento algum além da lesão; Grupo II, onde os animais foram tratados com aplicação do laser de baixa energia e comprimento de onda de 685 nm. Por último, no grupo III foram utilizados os comprimentos de onda de 685 nm e, a seguir, 780 nm. O equipamento utilizado foi o laser de diodo semiconductor de Arseneto de gálio de comprimento de onda de 685nm (visível) e 780 nm (infravermelho). De acordo com os autores, as feridas tratadas com laser (grupos

II e III) evidenciaram melhores resultados histológicos do que as do grupo controle. Nas feridas tratadas com 2 comprimentos de onda (grupo III), a reparação tecidual foi mais diferenciada que as feridas do grupo controle como também as do grupo II tratadas com apenas um comprimento de onda. No período de 14 dias, sob o ponto de vista biométrico, a contração tecidual foi mais significativa nas feridas do grupo III seguidas das do grupo II e controle.

Reddy (2003) estudou comparativamente em feridas cutâneas bilaterais provocadas no dorso de ratos diabéticos, o efeito de um laser visível (He-Ne, 632,8 nm) e um infra-vermelho (Arseneto de Gálio, 904 nm), com dose de energia de 1 J/cm². Observaram que as feridas tratadas com laser infra-vermelho demonstraram maior resistência à tração quando comparadas às feridas contra-laterais (controles) não tratadas. Concluíram que o laser de He-Ne mostrou-se mais efetivo que o laser infra-vermelho, o que evidencia, segundo os autores, que o efeito fotobiomodulador do laser pode estar na dependência do comprimento de onda e das propriedades eletromagnéticas da radiação.

Byrnes et al. (2004) estudaram o efeito da fotobiomodulação em feridas cutâneas provocadas em animais portadores de diabetes tipo II. Irradiaram feridas bilaterais provocadas no dorso de ratos, com laser de 632 nm de comprimento de onda. Observaram que as feridas demonstraram reparação mais favorável quando tratadas com dose de 4 J/cm² (16 mW, 250 segundos de exposição, durante 4 dias consecutivos).

Enwemeka et al. (2004) estudaram, através de uma meta-análise, a efetividade os lasers de baixa intensidade sobre os eventos da reparação tecidual e controle da dor. Concluíram que a fototerapia com laser em baixa intensidade é um elevado agente terapêutico, não só para a remissão de

sintomas dolorosos, como para aceleração do processo de reparo tecidual. Chamaram a atenção de que o comprimento de onda poderá influenciar a resposta tecidual.

Silva Neto (2004) estudou o processo de reparação em feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos e tratadas com laser isoladamente ou associado à droga fotossensibilizadora. Utilizaram laser emitido na faixa de 685 nm, com fluência de 2,5 J/cm² e 35 mW de potência. Concluíram que o laser em baixa intensidade isoladamente ou associado à droga fotossensibilizadora, mostrou-se efetivo no reparo tecidual, além de provocar danos no tecido tratado.

Lima et al., em 2004, estudaram o processo de reparação em feridas cutâneas retardadas pela ação térmica de um “punch” aquecido, de aproximadamente 8 mm de diâmetro. As feridas foram tratadas com laser 685 nm, 50 mW de potência, 90 segundos de exposição, fluência de 4,5 J/cm² e laser associado à droga fotossensibilizadora (azul de toluidina O). Observou que as feridas que não sofreram nenhum tratamento apresentavam processo de reparo retardado, porém as tratadas com laser isoladamente ou com azul de toluidina e laser, nos parâmetros estudados, o processo de reparação mostrou-se bem mais diferenciado.

Pessoa et al. (2004) realizaram feridas cutâneas na região dorsal de ratos tratados com cortisona e trataram-nas com laser em baixa intensidade (904 nm, 2,75 mW, 2,900 Hz, 120 s, 33 J/cm²). Decorridos 3, 7 e 14 dias, observaram que as feridas tratadas com laser demonstraram aceleração da reparação tecidual. Salientaram que o laser atua como um agente coadjuvante balanceando os efeitos indesejáveis da cortisona sobre a reparação tecidual.

A eficácia da terapia através do laser no reparo de feridas foi investigada recentemente por Woodruff et al. (2004), através de uma meta-análise que envolveu vários trabalhos, os quais tiveram seus dados computados e codificados depois de separados por rigoroso critério de inclusão e exclusão. A proposta principal do trabalho foi a de agregar a literatura pertinente para determinar objetivamente o efeito global da terapia a laser sobre o processo de reparo. O objetivo secundário foi o de elucidar questões que podem ser úteis para pesquisadores e clínicos no desenvolvimento de bases terapêuticas efetivas. Os trabalhos foram obtidos de diversas fontes, sendo que os critérios de inclusão estabelecidos foram: 1) tipo de laser e o comprimento de onda definidos; 2) laser claramente identificado como variável independente; 3) pelo menos um índice de reparo de feridas, como o conteúdo colágeno e o tempo de cicatrização, identificados como variáveis independentes, associadas ao tempo utilizado de tratamento na tentativa de incrementar o reparo tecidual, contração da área, aceleração do processo inflamatório e prevenção da necrose. Foram estabelecidos pelos autores ou pela revisão da meta-análise os parâmetros de tratamento, tais como: potência, densidade de potência, energia, densidade de energia, duração de cada tratamento, frequência do tratamento, dose expressada em joules (J/cm^2), diâmetro do feixe, tamanho da área tratada e modo de aplicação (contato pontual ou não contato), sendo que as condições tratadas estavam claramente estabelecidas, como, por exemplo, escaras, úlceras ou pós-operatório cirúrgico. Os critérios de exclusão foram: 1) estudos *in vitro* envolvendo células e tecidos não animais, 2) relatos de casos ou casos simples sem considerar a etiologia, 3) estudos com dados nos quais a estatística de Cohen não poderia ser calculada usando-se as correspondentes fórmulas

estatísticas, 4) estudos relatados em linguagem que não podia ser interpretada. Os autores concluíram que a terapia a laser de baixa energia é uma modalidade efetiva no tratamento e reparo de feridas. Concluíram também que o resultado do tratamento varia de acordo com os parâmetros utilizados, como potência, densidade de potência, comprimento de onda, perfil do feixe, energia, densidade de energia, número de aplicações, frequência e duração do tratamento, sendo que a densidade de energia parece ser o único parâmetro de tratamento com previsibilidade de efeito dose dependente.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Constitui propósito do presente estudo avaliar, histologicamente, nos períodos pós-operatórios de 3, 7 e 14 dias, a influência da nicotina e do laser em baixa intensidade no processo de reparo em feridas cutâneas provocadas em ratos tratados ou não com nicotina, com relação a:

1. Migração de células epiteliais sobre a ferida e seu grau de diferenciação.
2. Maturação do tecido conjuntivo subjacente à área lesada traduzida pela população celular, formação e disposição de fibras colágenas.

Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação animal da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP (Processo n. 0043/2003).

Foram utilizados 115 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, com 120 dias em média de vida e peso variando entre 220 e 320 gramas procedentes do biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP. Os animais mostravam-se sadios e em condições satisfatórias para receberem os procedimentos operatórios. Os animais do experimento foram divididos aleatoriamente em 4 grupos.(Tabela 1)

Os animais do **grupo I** (n=29) foram tratados com injeção subcutânea de soro fisiológico e as feridas não receberam nenhum tratamento; os do **Grupo II** (n=30) foram tratados com injeção de soro fisiológico e as feridas tratadas com laser em baixa intensidade. Por outro lado os animais do grupo **Grupo III** (n=29), receberam injeção de nicotina e as feridas não receberam nenhum tratamento, enquanto que os do **Grupo IV** (n=27) receberam injeção de nicotina sendo as feridas tratadas com laser em baixa intensidade.

Os animais foram mantidos em gaiolas próprias para tal fim durante todo o período experimental, tomando-se o cuidado de deixar apenas 5 animais por gaiola, mantendo-os em ambiente com temperatura média de 28 graus Celsius, com controle de luz ambiente, recebendo alimentação balanceada e água à vontade durante todo o período do experimento.

Todos os animais do Grupo I e II foram tratados com injeções diárias subcutâneas de soro fisiológico, fragmentadas em duas aplicações, sendo uma no período da manhã e outra, no final da tarde, com intervalo de 12 horas e durante todos os trinta dias que antecederam aos procedimentos cirúrgicos, e mantidas até o sacrifício dos animais. As infusões foram suspensas em ambos os grupos somente no dia dos procedimentos cirúrgicos e dos respectivos sacrifícios.

Os animais tratados com nicotina (Grupos III e IV) foram pesados semanalmente durante todo período experimental com o objetivo de se estabelecer corretamente as doses de aplicação da mesma. A nicotina foi aplicada por intermédio de injeção administrada por via subcutânea, fragmentadas em duas infusões diárias, com intervalo de 12 horas, mantidas por um período de 30 dias antes dos procedimentos cirúrgicos e, diariamente até o sacrifício dos animais.

Grupos	G I (Soro)	G II (Soro/laser)	G III (Nicotina)	G IV (Nicotina/laser)	Total
3 dias	9	10	9	9	37
7 dias	10	10	10	9	39
14 dias	10	10	10	9	39
Total	29	30	29	27	115

Tabela 1. Distribuição dos Grupos, períodos experimentais e número de animais.

4.1. PREPARO DA DROGA

A preparação do hemissulfato de nicotina* (Fig.1) foi realizada através da diluição em solução fisiológica na concentração de 5mg/ml segundo a literatura (OKAMOTO et al., 1994).

Cada animal recebeu uma dose da solução equivalente a 3mg/kg de peso corporal do animal, em duas aplicações diárias. A solução foi mantida em frasco com proteção externa de papel alumínio e acondicionada em geladeira durante todo o período de experimentação.

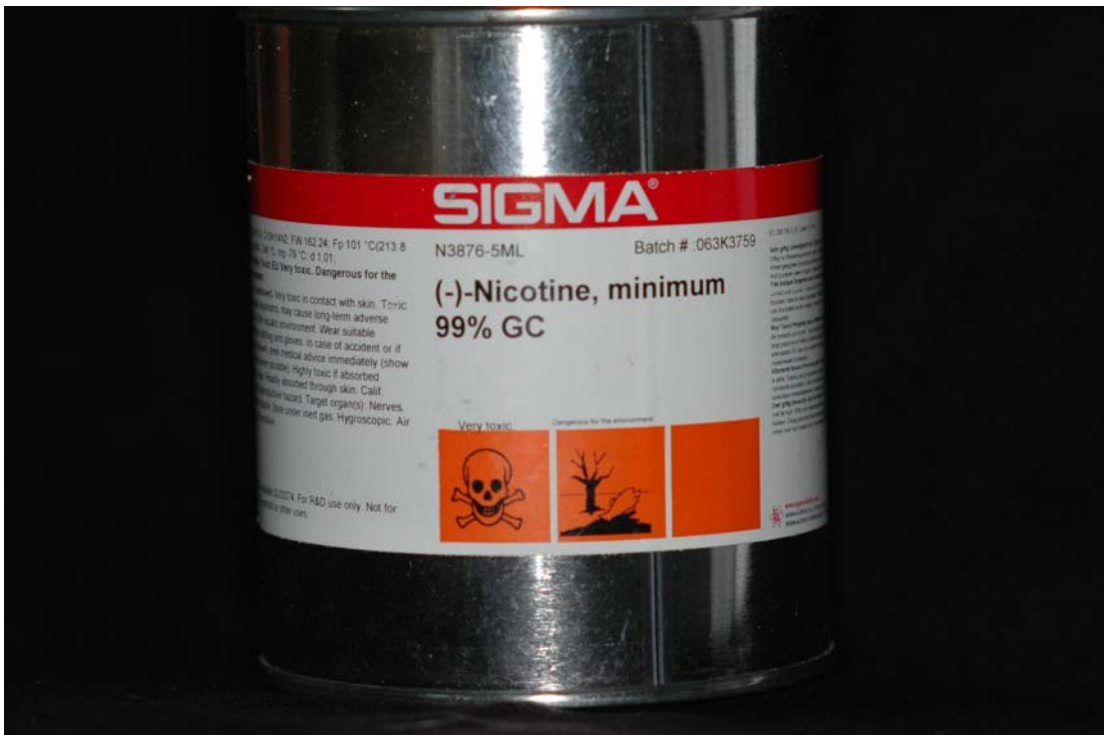


Figura 1. Apresentação comercial da nicotina utilizada.

* Sigma corporation, São Paulo - Brasil.

4.2. ADMINISTRAÇÃO DA DROGA E DA SOLUÇÃO FISIOLÓGICA.

A administração de solução fisiológica de Cloreto de sódio 0,9 % e do hemissulfato de nicotina teve início 30 dias antes dos procedimentos cirúrgicos sendo mantida até o dia do sacrifício do animal. O local de escolha da infusão foi o dorso do rato, o mais próximo possível da região cefálica, para que não interferisse na área do experimento (Fig.2). As condições de infusão, como tipo de agulha, volume de solução e horários foram idênticas para todos os grupos.



Figura 2. Modo de aplicação do hemissulfato de nicotina e da solução de cloreto de sódio.

4.3. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E APLICAÇÃO DO LASER.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados ao final de 30 dias de aplicação das respectivas soluções (soro fisiológico e nicotina) para todos os grupos. Com a suspensão da administração das drogas somente neste dia, os animais foram submetidos à anestesia geral através da Ketamina (Francotar – São Paulo, Brasil), na dosagem de 0,04 ml / 100 gramas do peso corporal do animal, administrada por via intramuscular (Fig.3) e relaxante muscular na dosagem de 0,02 ml/100 gramas de peso corporal (Cloridato de Xilazina - Coopers - São Paulo- Brasil). Imediatamente após a anestesia, procedeu-se a tricotomia da região dorsal e desinfecção da área, realizada com solução de Digluconato de clorexidina 1% (DM, São Paulo - Brasil)(Fig.4).

Por intermédio de um “punch” de aproximadamente 8 mm de diâmetro (Fig.5) foi realizada a remoção de um fragmento circular da pele na região dorsal dos animais, localizada na porção média entre a região crânio-caudal , orientada pelo plano longitudinal do animal (Fig. 6).



Figura 3. Anestesia e relaxante muscular aplicados.



Figura 4. Tricotomia da região dorsal.

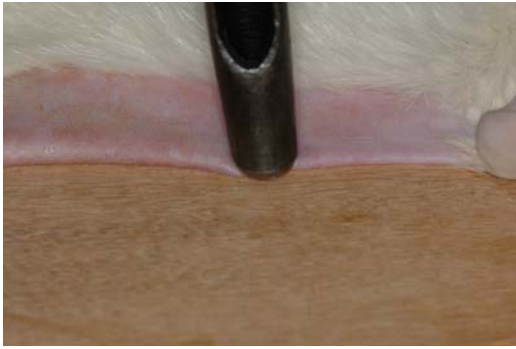


Figura 5. Posicionamento do *punch*.



Figura 6. Ferida cirúrgica provocada.

Nos animais dos Grupos II e IV as feridas foram, imediatamente após sua execução, submetidas a aplicações de Laser. O emissor Laser utilizado no presente estudo foi o modelo Bio WAVE LLLT (Kondortech Equipamentos Odontológicos, São Carlos, São Paulo, Brasil), emissor de Arseneto de Gálio e Alumínio, emissão contínua e pulsada, nos comprimentos de onda de 660 nm (visível) e 830 nm (infravermelho) (Fig.7). O protocolo utilizado seguiu os seguintes parâmetros:

Emissão: Contínua

Comprimento de onda: 660 nm (*vermelho*)

Potência: 40 mW

Área: 0,071 cm²

Diâmetro da ponteira: 3 mm

Energia: 3,0 J

Tempo de exposição pontual: 5.32 s (por ponto)

Tempo de exposição total: 47,88 s

Modo de aplicação: laser contato pontual .

Fluência (Densidade energética): 0,56 W / cm²

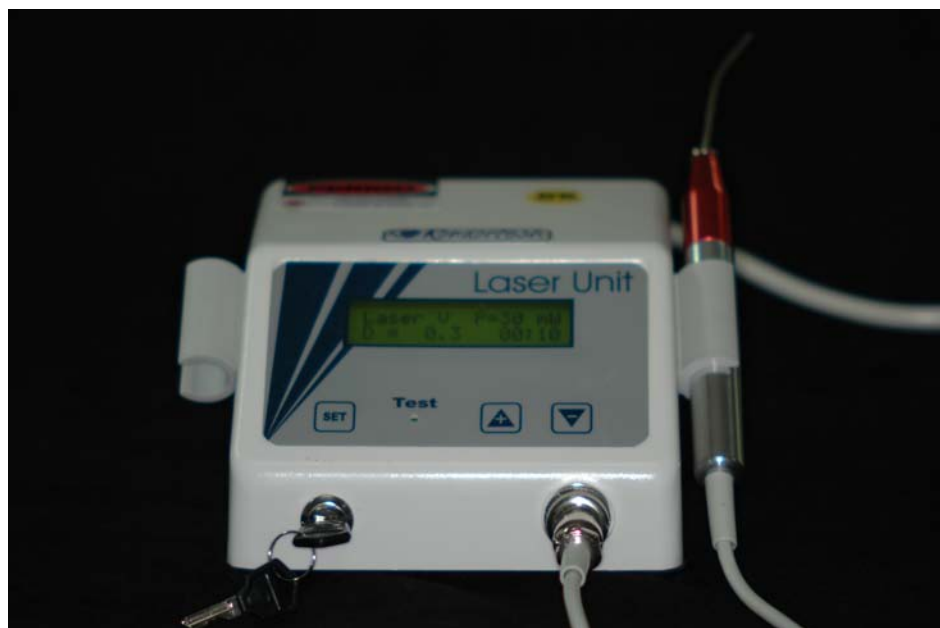


Figura 7. Emissor laser de baixa intensidade de potência utilizado.

As feridas foram irradiadas segundo a técnica de Garcia (1992) em oito pontos distribuídos na porção externa da ferida (Fig. 8) e em um ponto da região central da mesma (Fig. 9).



Figura 8. Aplicação contato pontual na borda da lesão.



Figura 9. Aplicação contato pontual no centro da lesão.

4.4. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os animais foram sacrificados aos 3,7 e 14 dias de pós-operatório através da inalação excessiva de éter sulfúrico. As biópsias foram cuidadosamente obtidas, de forma tal que envolveu parte da pele adjacente às bordas da ferida e de todo o tecido cicatricial na sua profundidade, permanecendo em formalina a 10% por um período mínimo de 24 horas. A seguir, as peças sofreram o trâmite laboratorial de rotina, sendo incluídas em parafina, orientadas de forma a permitir a realização de cortes transversais, semi-seriados de 6 micrometros de espessura. Os cortes histológicos obtidos foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina para análise histológica.

Resultado

5 RESULTADO

Na análise descritiva dos resultados, foram consideradas principalmente as áreas situadas junto às bordas e centro das feridas em função dos diferentes grupos e períodos pós-operatórios.

- 3 DIAS -

Grupo I (Soro fisiológico). Junto às bordas da ferida cirúrgica os espécimes deste grupo apresentaram extensas áreas ocupadas por infiltrado inflamatório com predominância de polimorfonucleares neutrófilos, muito dos quais em processo degenerativo. Podem ser observados também macrófagos e linfócitos na região correspondente à análise. Nenhum corte histológico deste grupo apresentava proliferação epitelial. Em direção ao centro da ferida, as características são bastante semelhantes, sendo que em alguns casos, entretanto, o número de células inflamatórias foi menor, com predominância de macrófagos e linfócitos (Fig. 10).

Grupo II (Soro fisiológico + Laser). Junto às bordas da ferida nota-se discreta camada ocupada por numerosos polimorfonucleares neutrófilos, alguns dos quais em degeneração. Nas áreas localizadas mais profundamente, evidencia-se pequeno número de fibroblastos e alguns macrófagos e linfócitos. Em direção ao centro da ferida, observa-se a presença de espessa camada de crosta seguida de delgada camada ocupada por polimorfonucleares neutrófilos, a maioria em degeneração (Fig.11). Nas áreas mais profundas evidencia-se discreto número de fibroblastos ao lado de raros linfócitos (Fig. 12).

Grupo III (Nicotina). Nas proximidades da borda da ferida observa-se junto à superfície, áreas ocupadas por neutrófilos degenerados e ausência de proliferação epitelial (Fig.13). Nas áreas mais afastadas do centro da lesão, observam-se extensas áreas ocupadas por moderado número de polimorfonucleares neutrófilos e linfócitos. Mais em direção ao centro da ferida, as características junto à superfície são semelhantes às observadas junto às bordas. Nas áreas mais afastadas da superfície, a população celular é mais discreta (Fig.14).

Grupo IV (Nicotina + Laser). Em direção ao centro da ferida, notam-se extensas áreas ocupadas por moderado número de macrófagos, linfócitos e alguns fibroblastos (Fig.15). Na superfície da ferida, junto às bordas, observam-se áreas ocupadas por elevado número de células, principalmente polimorfonucleares neutrófilos, muitos em degeneração. Contígüamente existe discreta faixa ocupada por pequeno número de fibroblastos, macrófagos e linfócitos ao lado de alguns polimorfonucleares neutrófilos (Fig.16).

- 7 DIAS -

Grupo I (Soro fisiológico). Nas proximidades das bordas das feridas observa-se a proliferação do epitélio, mostrando-se com espessa camada nas proximidades do tecido pré-existente (Fig.17). O tecido conjuntivo subjacente apresenta moderado número de fibroblastos ao lado de alguns macrófagos e linfócitos. Em direção ao centro da ferida, o tecido conjuntivo subepitelial mostra numerosos capilares neoformados, discreto número de fibroblastos ao lado de

macrófagos e linfócitos (Fig.18). Em alguns casos o epitélio recobre a totalidade da ferida cirúrgica.

Grupo II (Soro fisiológico + Laser). Em todos os espécimes o epitélio recobre totalmente a ferida cirúrgica mostrando-se bem diferenciado em alguns pontos. O tecido conjuntivo subjacente apresenta-se pouco desenvolvido com moderado número de fibroblastos que geralmente não apresentam orientação definida. Por outro lado, é pequeno o número de vasos sanguíneos (Fig. 19).

Grupo III (Nicotina). Em toda a extensão da ferida observa-se espessa camada de crosta seguida de faixa ocupada por polimorfonucleares, muitos em degeneração (Fig.20). Não há evidência de proliferação epitelial. Nas áreas mais profundas observam-se extensas áreas ocupadas por exsudato inflamatório, notando-se também pequeno número de macrófagos e linfócitos. Em alguns casos, pode ser evidenciado em locais afastados da superfície da ferida, tecido conjuntivo exibindo alguns fibroblastos, macrófagos e linfócitos ao lado de vasos sanguíneos (Fig. 21).

Grupo IV (Nicotina + Laser). Em alguns espécimes do grupo IV o epitélio recobre a ferida cirúrgica em sua totalidade, mostrando-se pouco diferenciado (Fig.22). Em outros, este epitélio recobre apenas parcialmente a ferida cirúrgica. O tecido conjuntivo em todos os casos era pouco desenvolvido evidenciando moderado número de fibroblastos, alguns linfócitos e macrófagos. (Fig.23).

- 14 DIAS -

Grupo I (Soro fisiológico). Em todos os espécimes, o epitélio recobre totalmente a ferida cirúrgica mostrando-se, em alguns pontos, bem desenvolvido. O tecido conjuntivo subjacente geralmente é bem desenvolvido com moderado número de fibroblastos dispostos paralelamente à superfície do epitélio. Por outro lado, é pequeno o número de vasos sanguíneos (Fig.24).

Grupo II (Soro fisiológico + Laser). O epitélio recobre totalmente a ferida em todas as amostras, mostrando-se em alguns espécimes, pouco diferenciado. O tecido conjuntivo subjacente mostra-se bem desenvolvido com discreto número de fibroblastos orientados paralelamente à superfície do epitélio. Em todos os casos, este tecido conjuntivo subjacente mostra pequeno número de vasos sanguíneos (Fig.25).

Grupo III (Nicotina). Em um dos espécimes o epitélio praticamente recobre a ferida cirúrgica permanecendo apenas discreta área sem recobrimento. Nas demais amostras, as feridas encontram-se recobertas parcialmente pelo epitélio pouco diferenciado. O tecido conjuntivo subjacente é pouco diferenciado, observando-se numerosos fibroblastos ao lado de macrófagos e linfócitos. Em direção ao centro da ferida, nota-se área ocupada por polimorfonucleares neutrófilos sobre a superfície da lesão, muitos dos quais em processo degenerativo. Mais profundamente observa-se discreto número de fibroblastos, ao lado de macrófagos e linfócitos (Fig. 27).

Grupo IV (Nicotina + Laser). Na maioria das amostras, o epitélio recobre a ferida cirúrgica, mostrando-se, no entanto, pouco diferenciado (Fig.28). O tecido conjuntivo subjacente junto às bordas da ferida é bem diferenciado com discreto número de fibroblastos que estão orientados paralelamente à superfície do epitélio. Nas áreas mais afastadas da borda da ferida, o tecido conjuntivo mostra maior número de fibroblastos (Fig. 28).

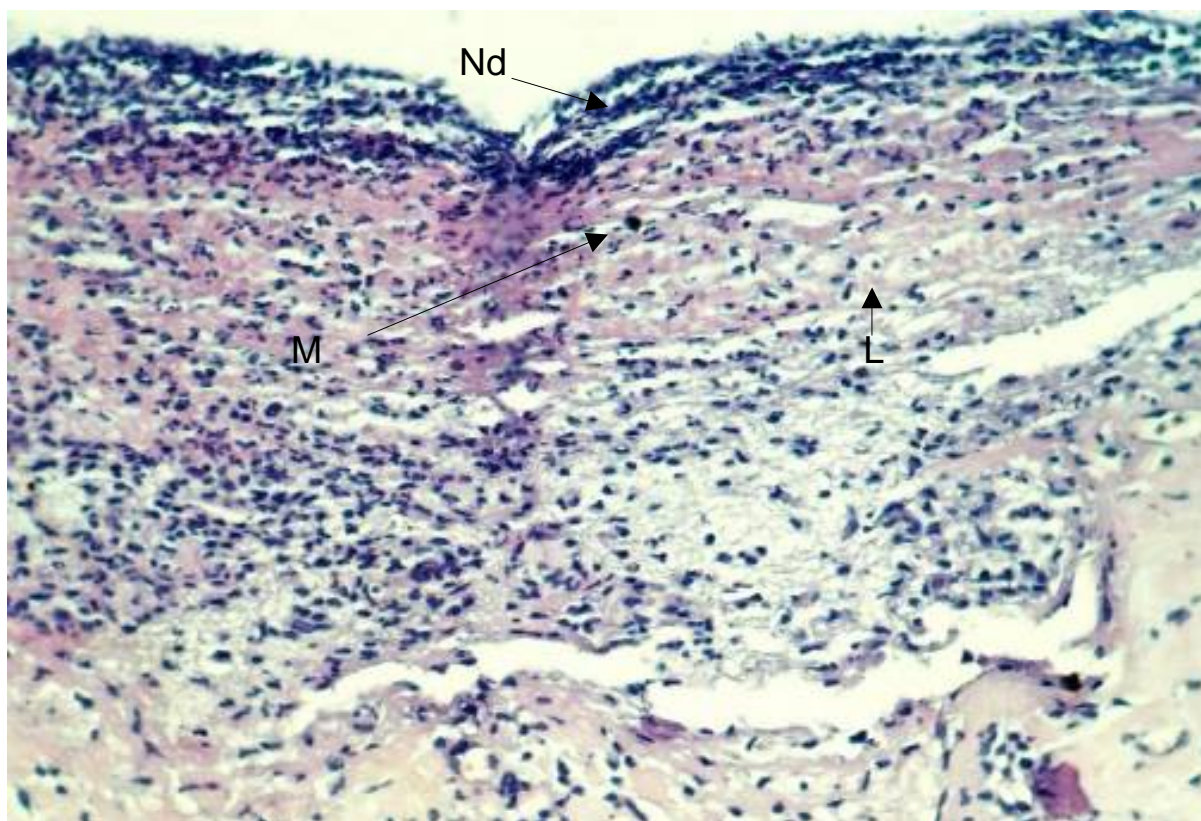


Figura 10. Grupo I (Soro fisiológico). 3 dias. Próximo à borda da ferida, os espécimes apresentam extensas áreas ocupadas por infiltrado inflamatório com predominância de polimorfonucleares neutrófilos, muitos dos quais em processo degenerativo. Nota-se ausência de recobrimento epitelial e predominância de macrófagos e linfócitos no conjuntivo subjacente. H.E. Aumento original 160 X. Infiltrado Inflamatório com predominância de polimorfonucleares neutrófilos em degeneração. (Nd); linfócitos (L); macrófago(M).

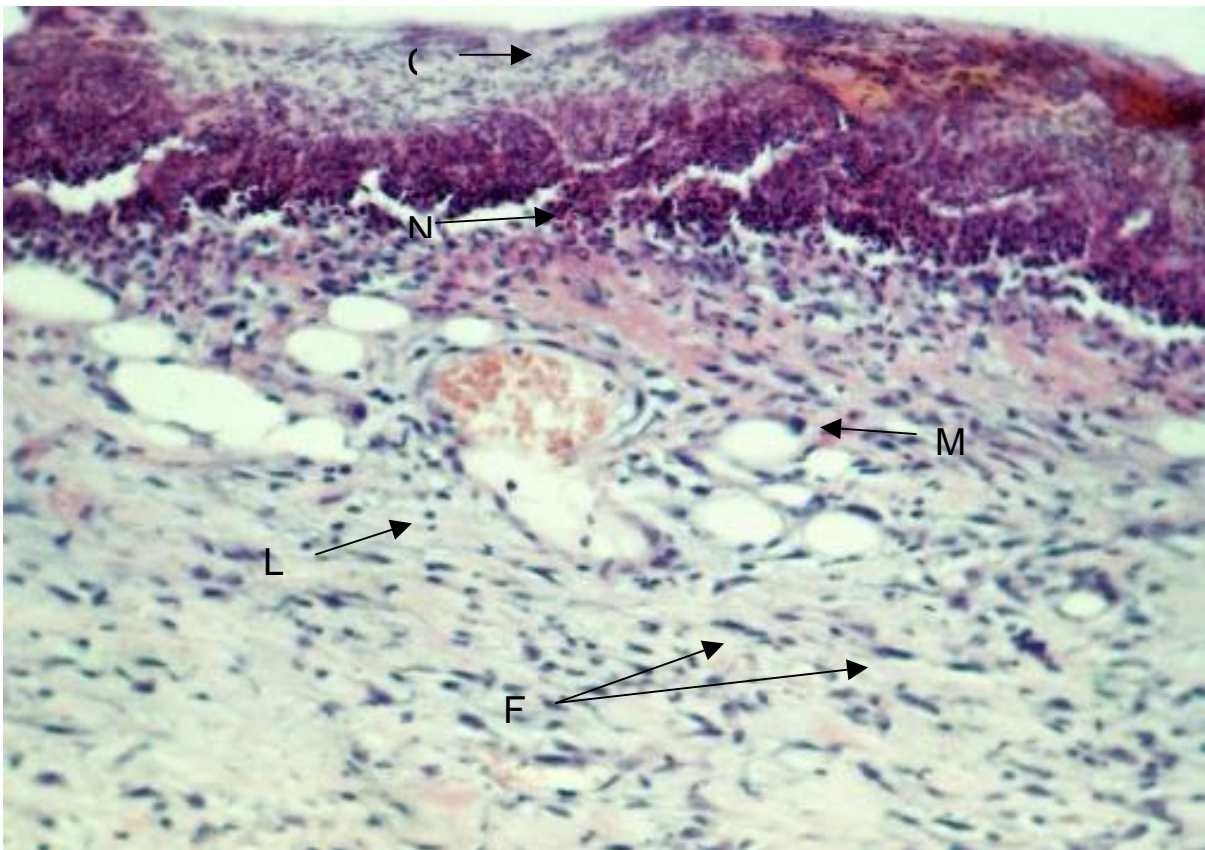


Figura 11. Grupo II (Soro fisiológico + Laser). 3 dias. Junto às bordas da ferida nota-se a presença de crosta e superfície ocupada por numerosos polimorfonucleares neutrófilos, alguns em degeneração. Nas áreas mais profundas evidencia-se pequeno número de fibroblastos, além de alguns macrófagos e linfócitos. H.E. Aumento original 160 X. Infiltrado inflamatório com predominância de polimorfonucleares neutrófilos (N); fibroblastos (F); macrófagos (M); Linfócitos (L); Crosta (C).

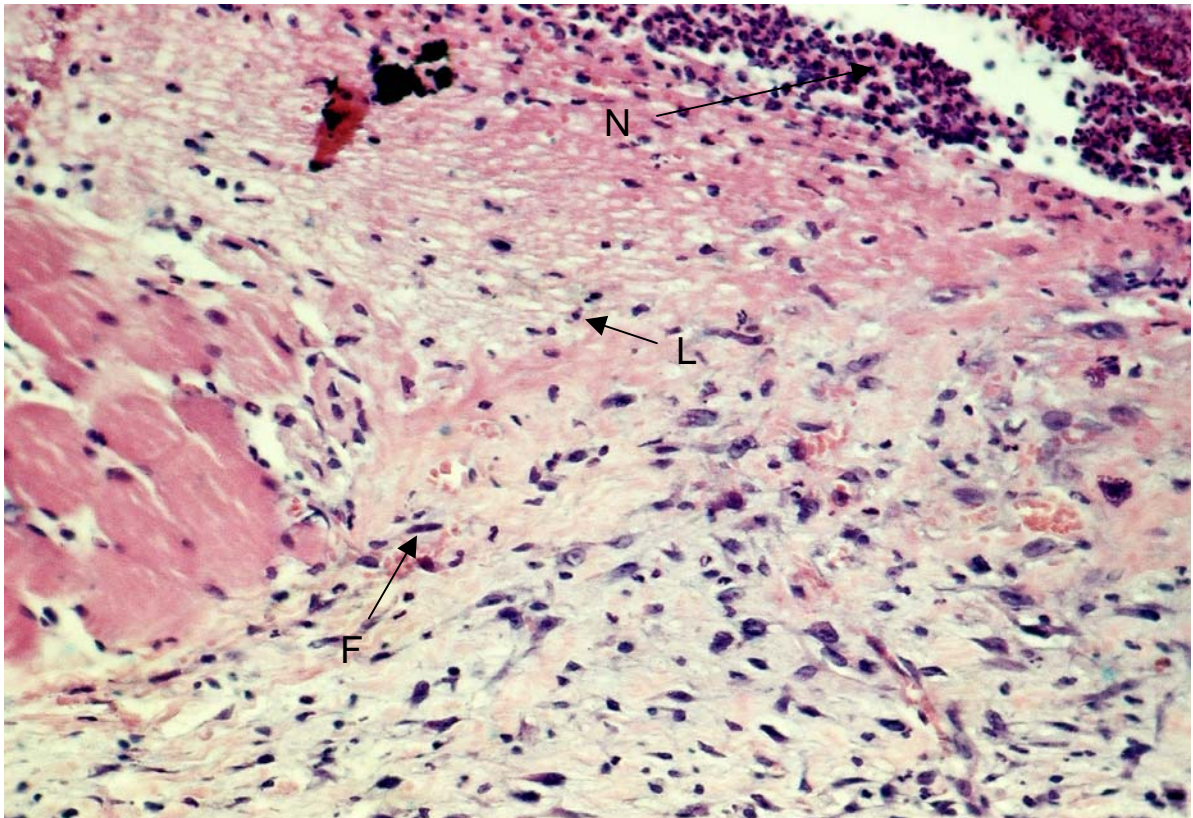


Figura 12. Grupo II (Soro fisiológico + Laser) 3 dias. Observa-se delgada camada ocupada por polimorfonucleares neutrófilos em degeneração. Discreto número de fibroblastos associados a raros linfócitos são evidenciados nas camadas mais profundas. H.E. Aumento original 160 X. Neutrófilos (N); linfócitos (L); fibroblastos (F).

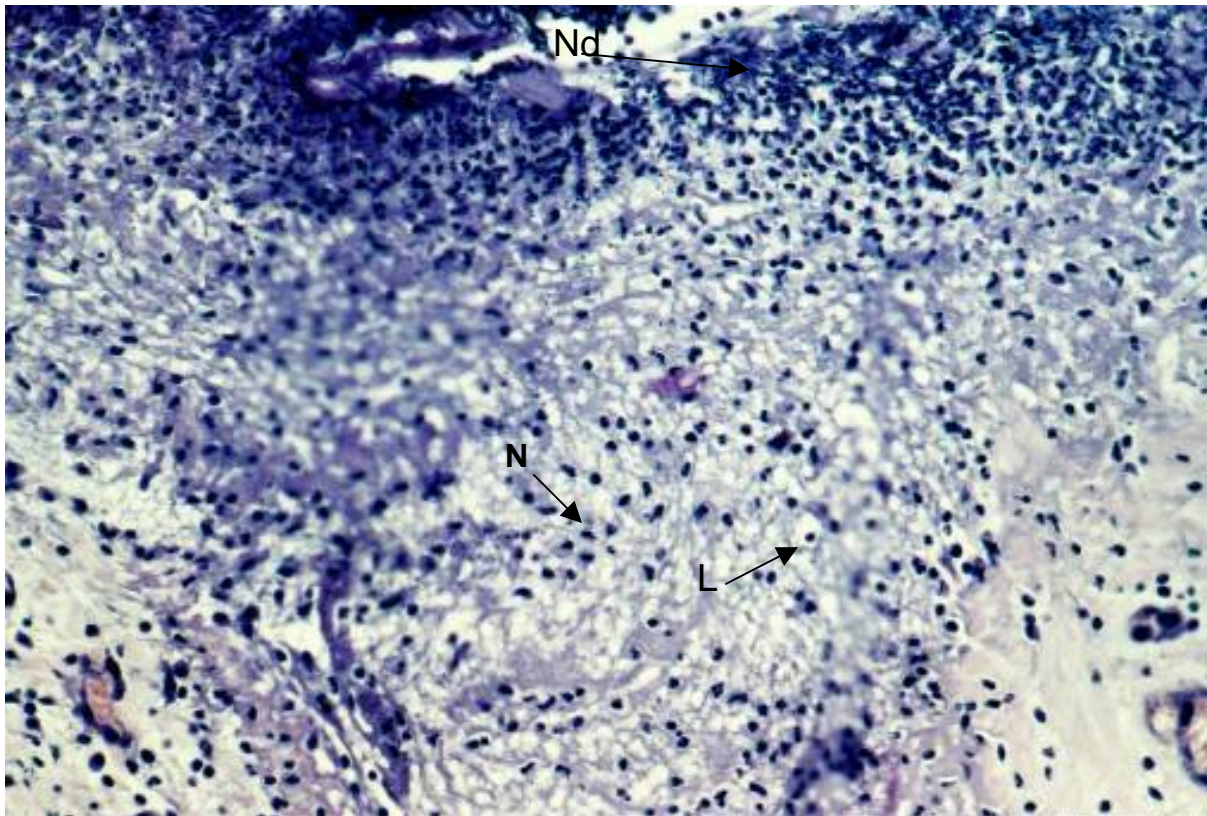


Figura 13. Grupo III (Nicotina). 3 dias. Próximo à borda da ferida observa-se áreas ocupadas por neutrófilos degenerados e ausência de proliferação epitelial. Nas áreas mais afastadas do centro da lesão, observa-se extensa área ocupada por moderado número de polimorfonucleares neutrófilos e linfócitos. H.E. Aumento original 160 X. Neutrófilos em degeneração (Nd); linfócito (L) neutrófilo (N).

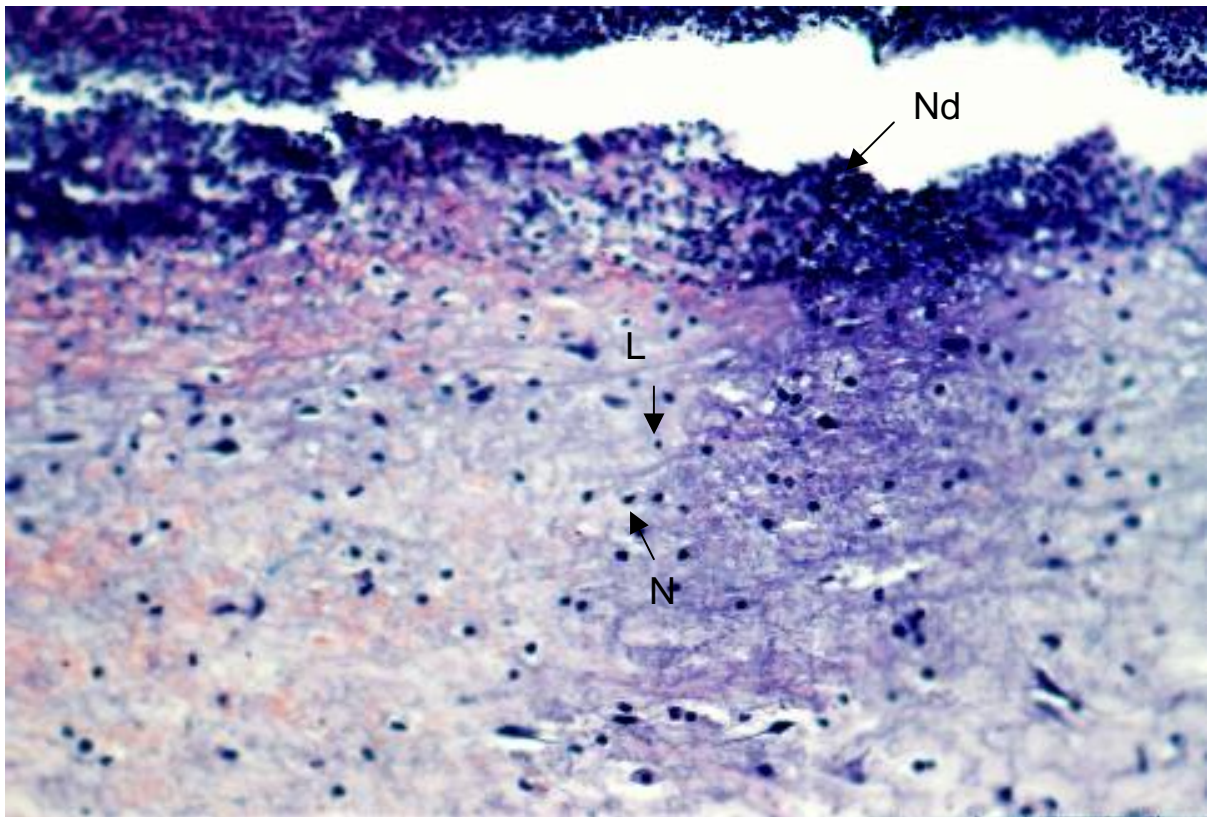


Figura 14. Grupo III (Nicotina). 3 dias. Área mais afastada do centro da lesão observa-se extensa área ocupada por moderado número de polimorfonucleares: neutrófilos e linfócitos. Nas áreas mais afastadas da superfície, a população celular é mais discreta. H.E. Aumento original. 160 X. Neutrófilos em degeneração (Nd) neutrófilos (N); linfócitos (L).

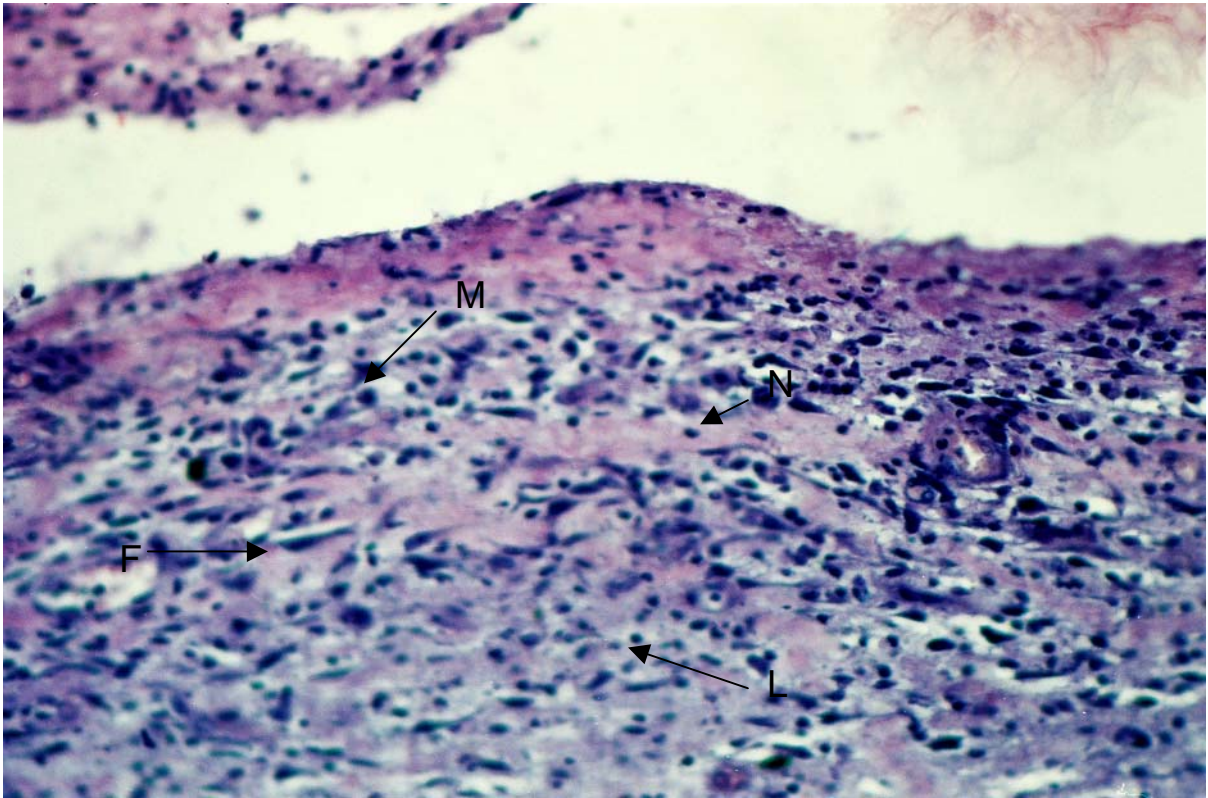


Figura 15. Grupo IV (Nicotina + Laser). 3 dias. Observa-se faixa ocupada por pequeno número de fibroblastos, macrófagos e linfócitos ao lado de alguns neutrófilos na porção central da lesão. H.E. Aumento original 160X. Fibroblastos (F); macrófagos (M); linfócitos (L); neutrófilos (N).

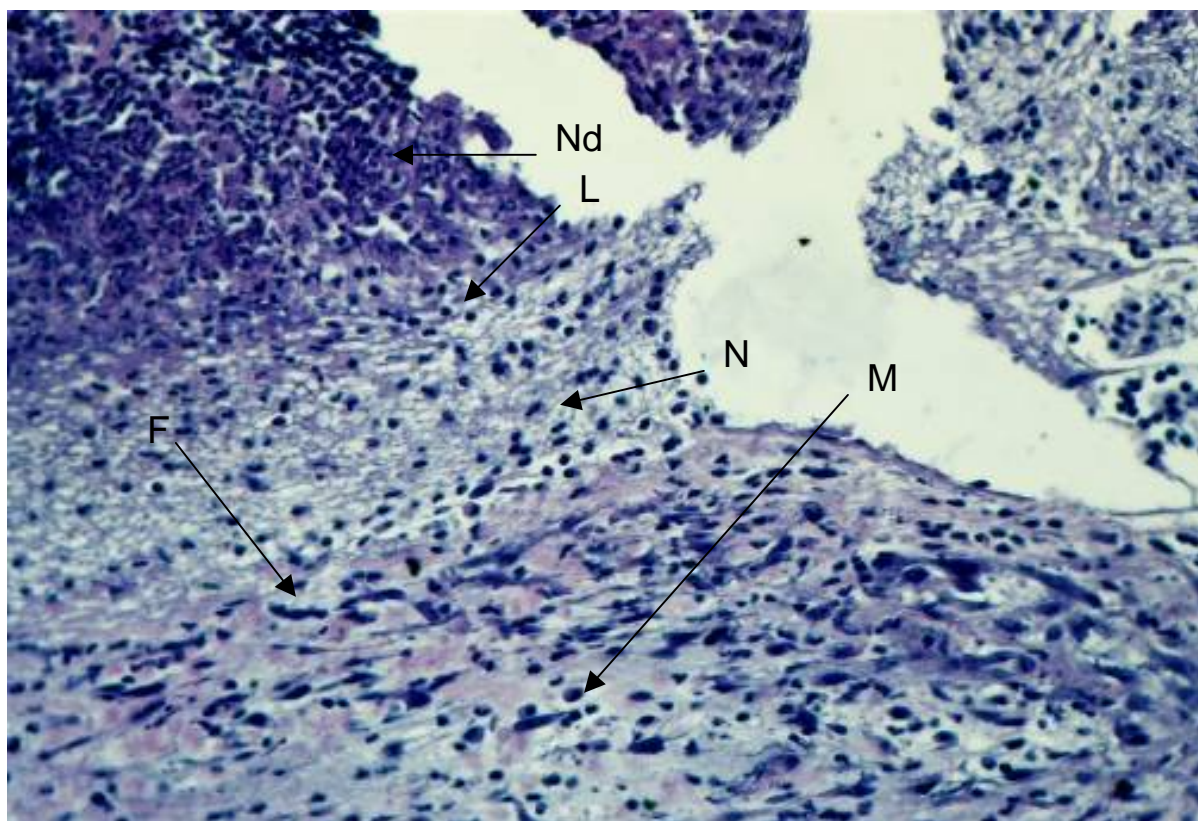


Figura 16. Grupo IV (Nicotina + Laser). 3 dias. A Superfície da ferida mostra, junto às bordas, áreas densamente ocupadas por elevado número de células, principalmente polimorfonucleares neutrófilos, muitos em degeneração. Contiguamente existe discreta faixa ocupada por pequeno número de macrófagos, linfócitos e fibroblastos. H.E. Aumento original 160 X. Polimorfonucleares neutrófilos em degeneração (Nd), neutrófilos (N); linfócitos (L); fibroblastos(F).

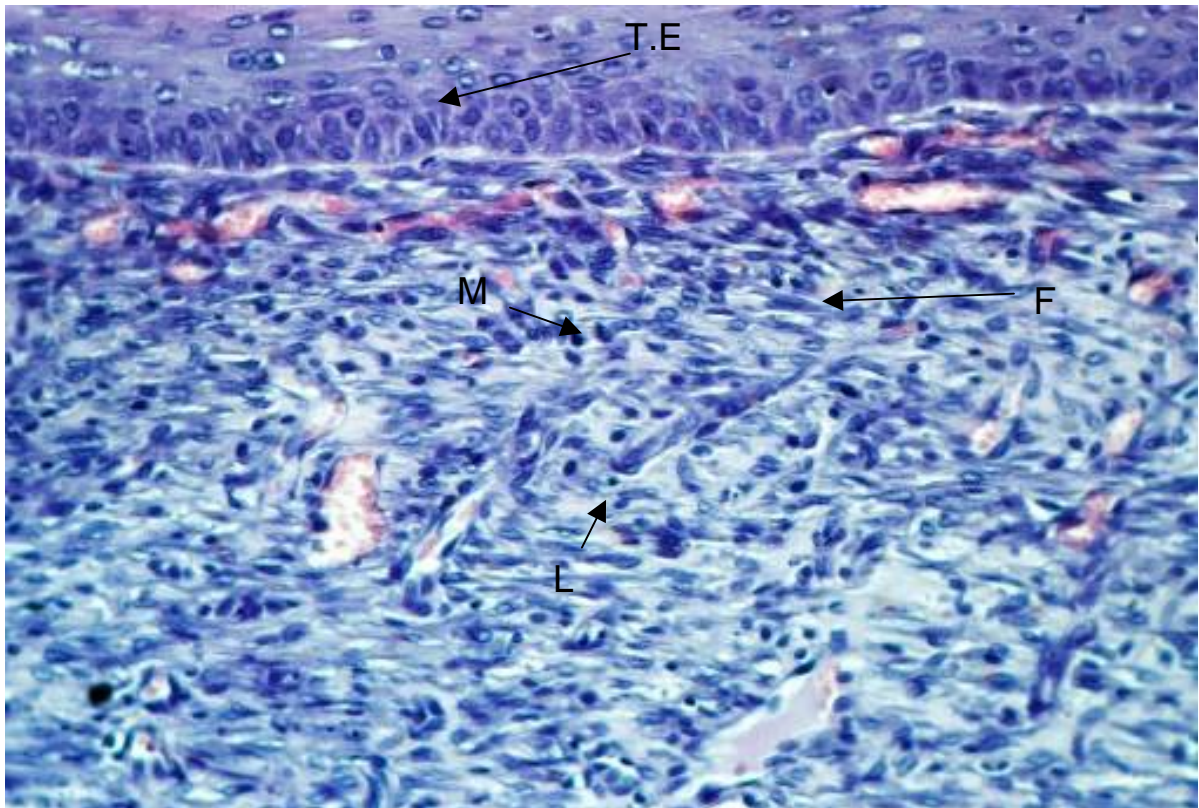


Figura 17. Grupo I (Soro fisiológico). 7 dias. Nas bordas da ferida, observa-se proliferação epitelial com espessa camada. O tecido conjuntivo subjacente apresenta moderado número de fibroblastos ao lado de alguns macrófagos e linfócitos. H.E. Aumento original 160 X. Tecido epitelial (T. E); fibroblastos (F); macrófagos (M); linfócitos (L).

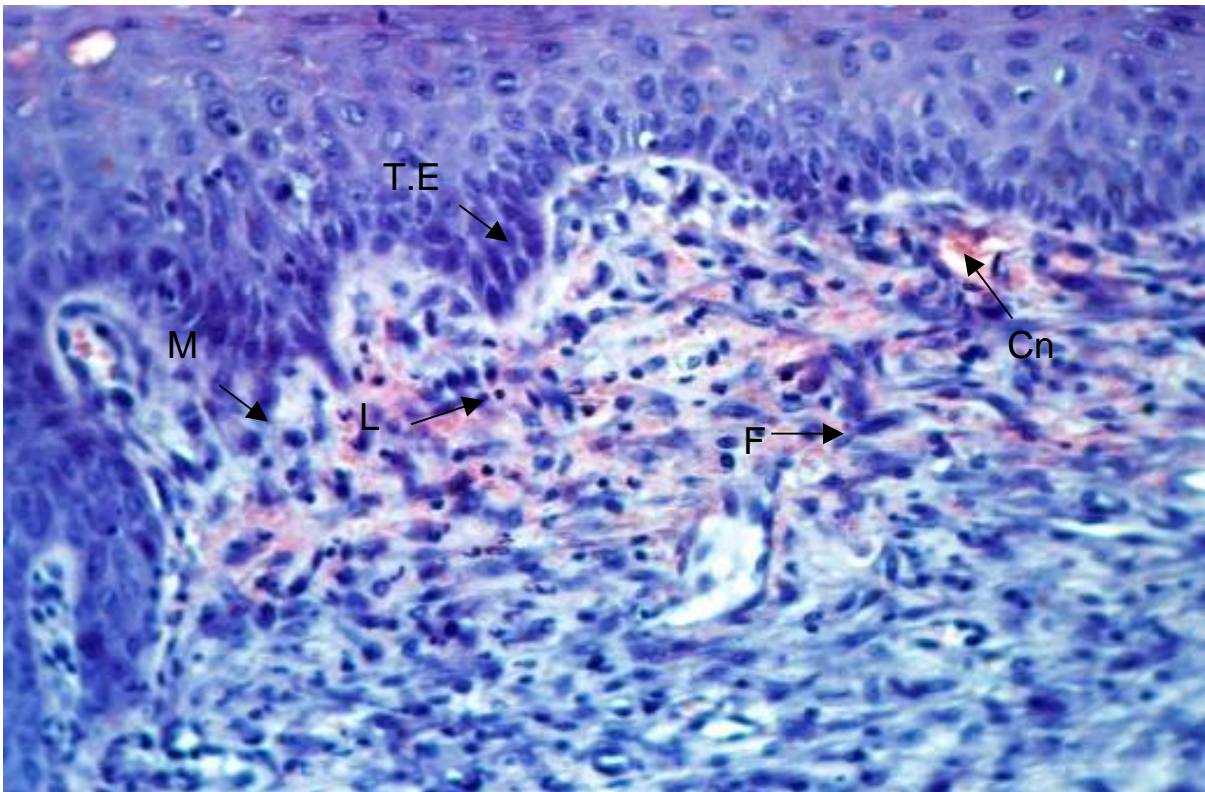


Figura 18. Grupo I (Soro fisiológico). 7 dias. O tecido conjuntivo subjacente apresenta moderado número de fibroblastos ao lado de alguns macrófagos e linfócitos. Em direção ao centro da ferida, o tecido conjuntivo subepitelial mostra numerosos capilares neoformados, discreto número de fibroblastos ao lado de macrófagos e linfócitos. H.E. Aumento original 160 X. Tecido epitelial (T. E); fibroblastos (F); macrófagos (M); linfócitos (L); capilares neoformados (Cn).

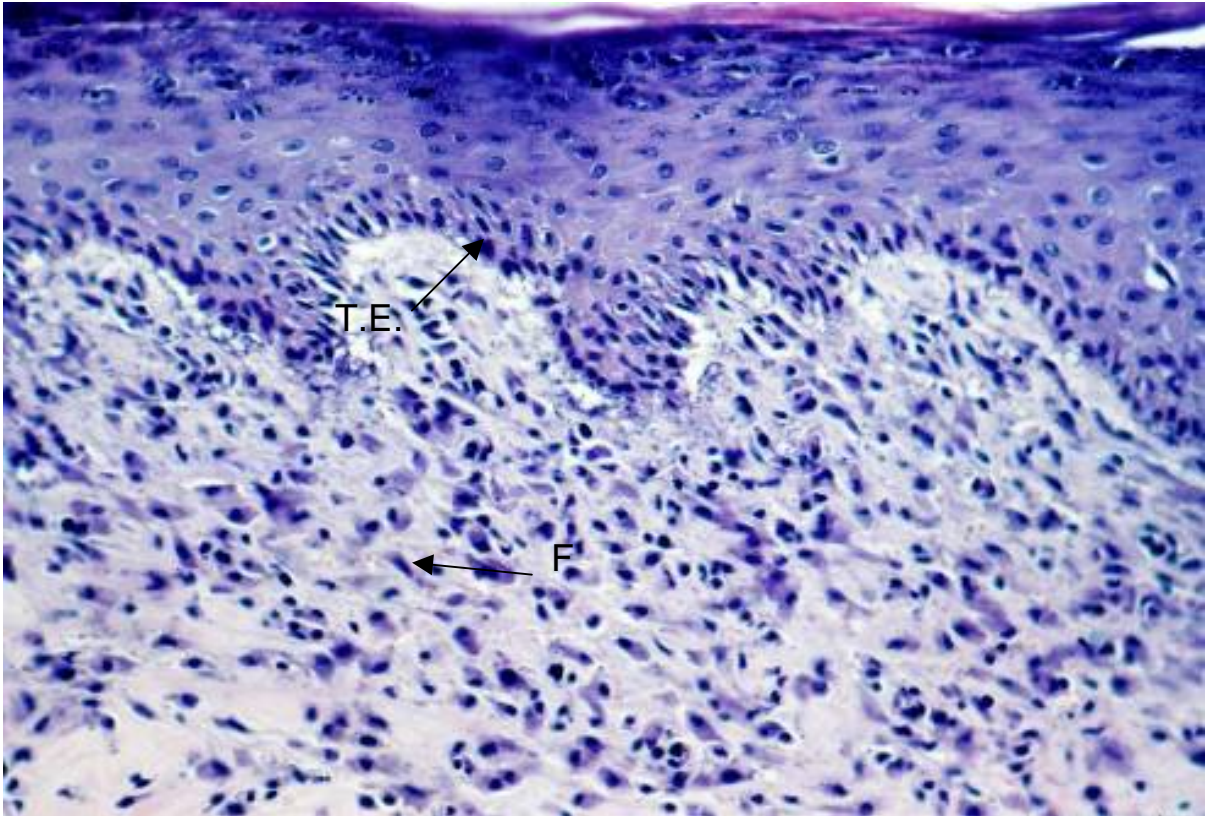


Figura 19. Grupo II (Soro fisiológico + Laser). 7 dias. Evidência de recobrimento epitelial da ferida cirúrgica em sua totalidade, com alguns pontos de epitélio bem diferenciado. O conjuntivo subjacente apresenta-se pouco desenvolvido com número moderado de fibroblastos sem orientação definida. H.E. Aumento original 160 X. Tecido epitelial (T. E); fibroblastos (F).



Figura 20. Grupo III (Nicotina). 7 dias. Observa-se espessa camada de crosta em toda extensão da ferida seguida de faixa ocupada por polimorfonucleares neutrófilos, muitos dos quais em processo de degeneração. Notam-se áreas extensas ocupadas por exsudato inflamatório nas áreas mais profundas além de pequeno número de macrófagos e linfócitos. H.E. Aumento original 63 X. Polimorfonucleares neutrófilos em degeneração (Nd); Crosta (C).

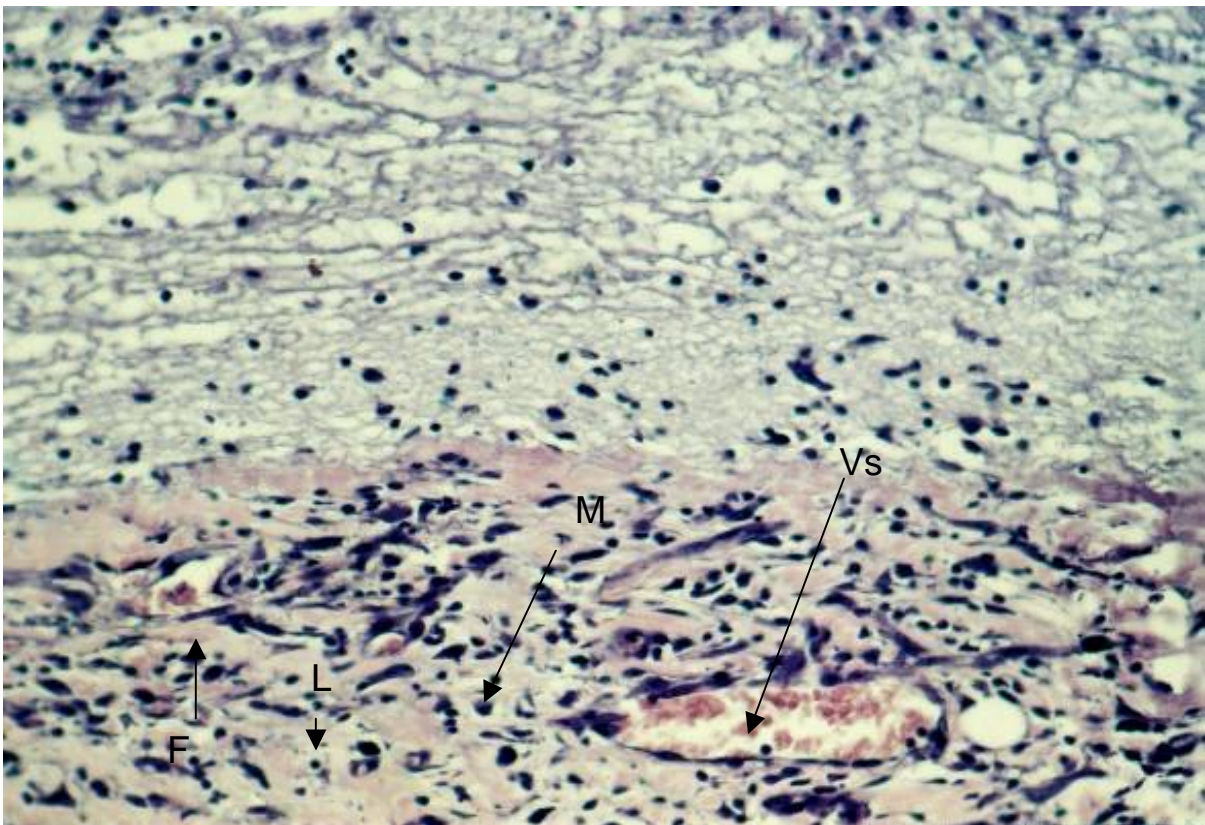


Figura 21. Grupo III (Nicotina). 7 dias. Nas áreas mais profundas o tecido conjuntivo evidencia extensas áreas ocupadas por infiltrado inflamatório, alguns fibroblastos, macrófagos e linfócitos ao lado de vasos sanguíneos. H.E. Aumento original 160 X. Vasos sanguíneos (Vs); macrófagos (M); linfócitos (L); fibroblastos(F)

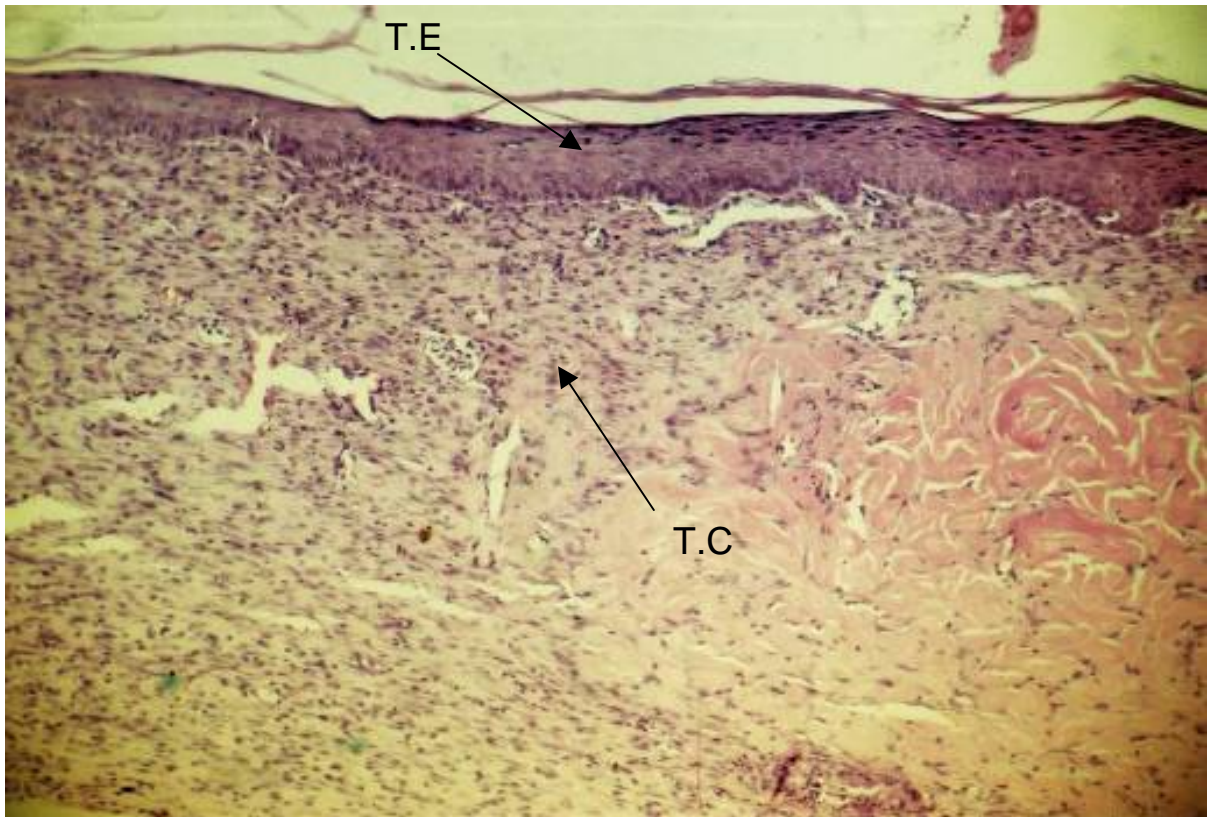


Figura 22. Grupo IV (Nicotina + Laser). 7 dias. Tecido epitelial recobre a totalidade da ferida cirúrgica, mostrando-se pouco diferenciado. O tecido conjuntivo mostra-se pouco diferenciado evidenciando moderado número de fibroblastos, linfócitos e macrófagos. H.E. Aumento original 63 X. Tecido epitelial pouco diferenciado (T. E); tecido conjuntivo pouco diferenciado (T. C).

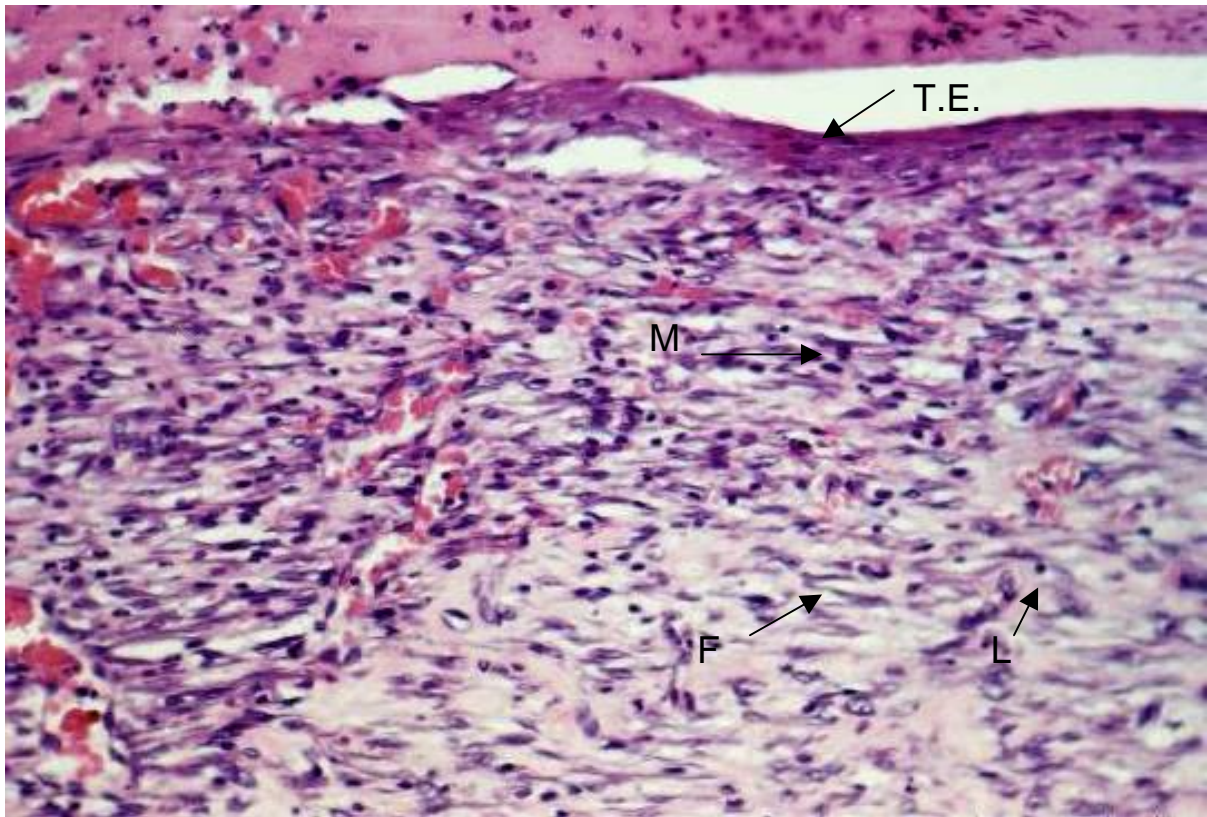


Figura 23. Grupo IV (Nicotina + Laser). 7 dias. Tecido conjuntivo mostra-se pouco diferenciado evidenciando moderado número de fibroblastos, linfócitos e macrófagos. H.E. Aumento original 160 X. Tecido epitelial pouco diferenciado (T. E); fibroblasto (F); linfócito (L); macrófago (M).

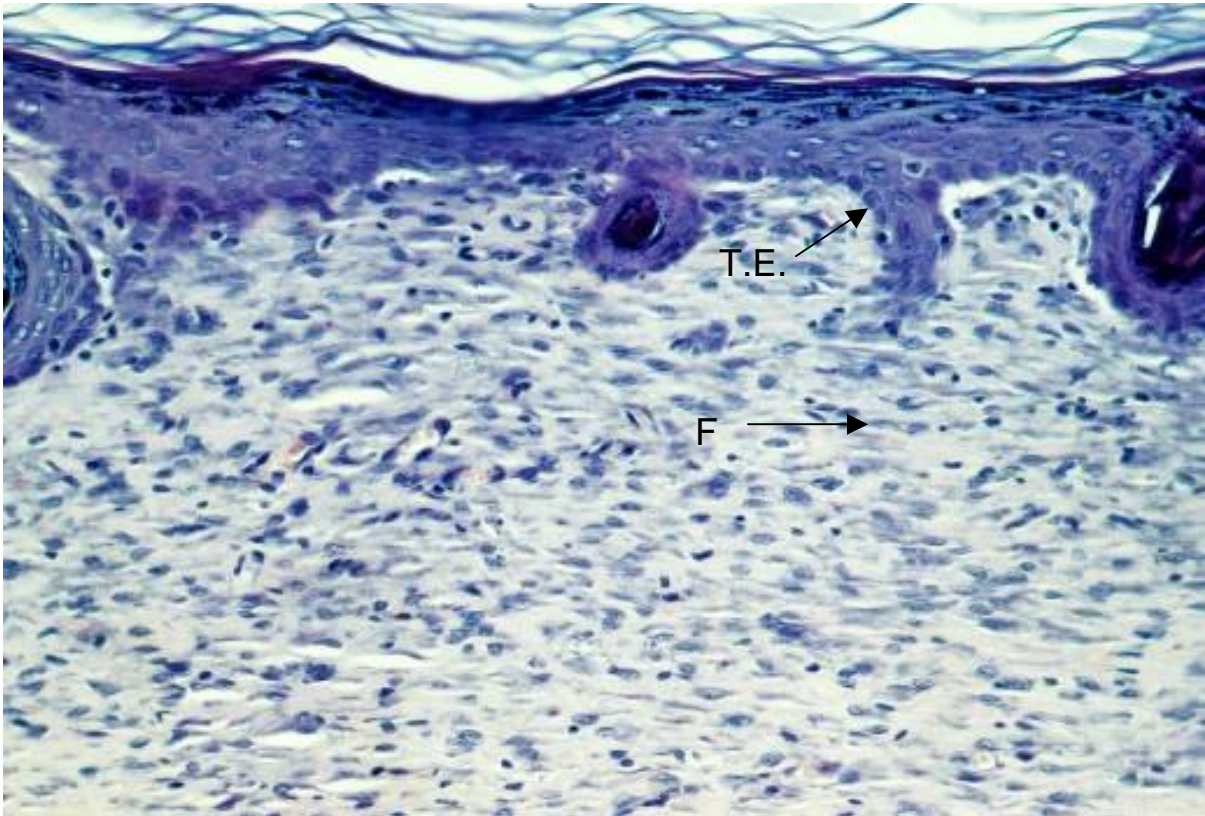


Figura 24. Grupo I (Soro fisiológico). 14 dias. O tecido epitelial recobre totalmente a ferida cirúrgica, mostrando-se bem desenvolvido em alguns pontos. O Tecido conjuntivo subjacente é bem diferenciado, com moderado número de fibroblastos dispostos paralelamente à superfície epitelial. H.E. Aumento original 160 X. Tecido epitelial (T. E); fibroblastos (F).

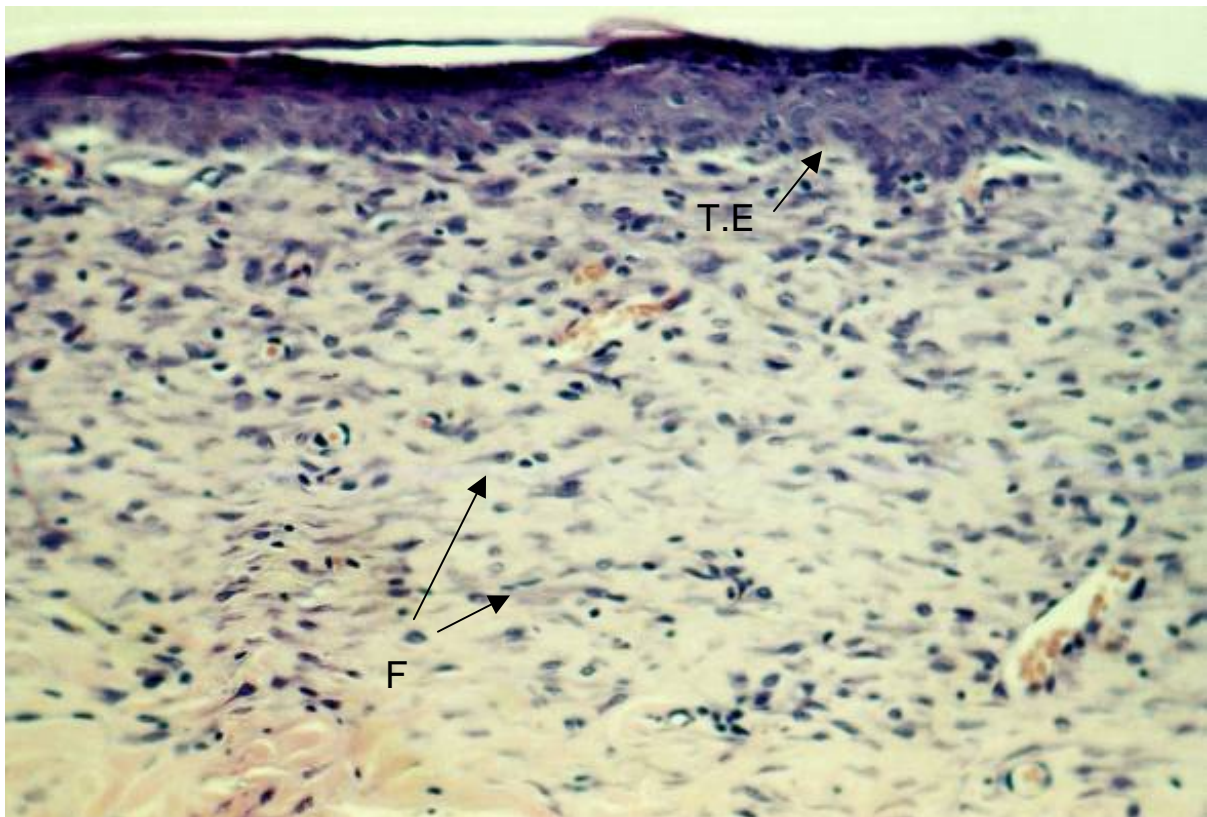


Figura 25. Grupo II (Soro fisiológico + Laser). 14 dias. O Tecido epitelial recobre totalmente a ferida mostrando-se pouco diferenciado. O Tecido conjuntivo subjacente apresenta-se bem desenvolvido com discreto número de fibroblastos orientados paralelamente à superfície do epitélio. H.E. Aumento original 160 X. Tecido epitelial (T. E); fibroblastos (F).

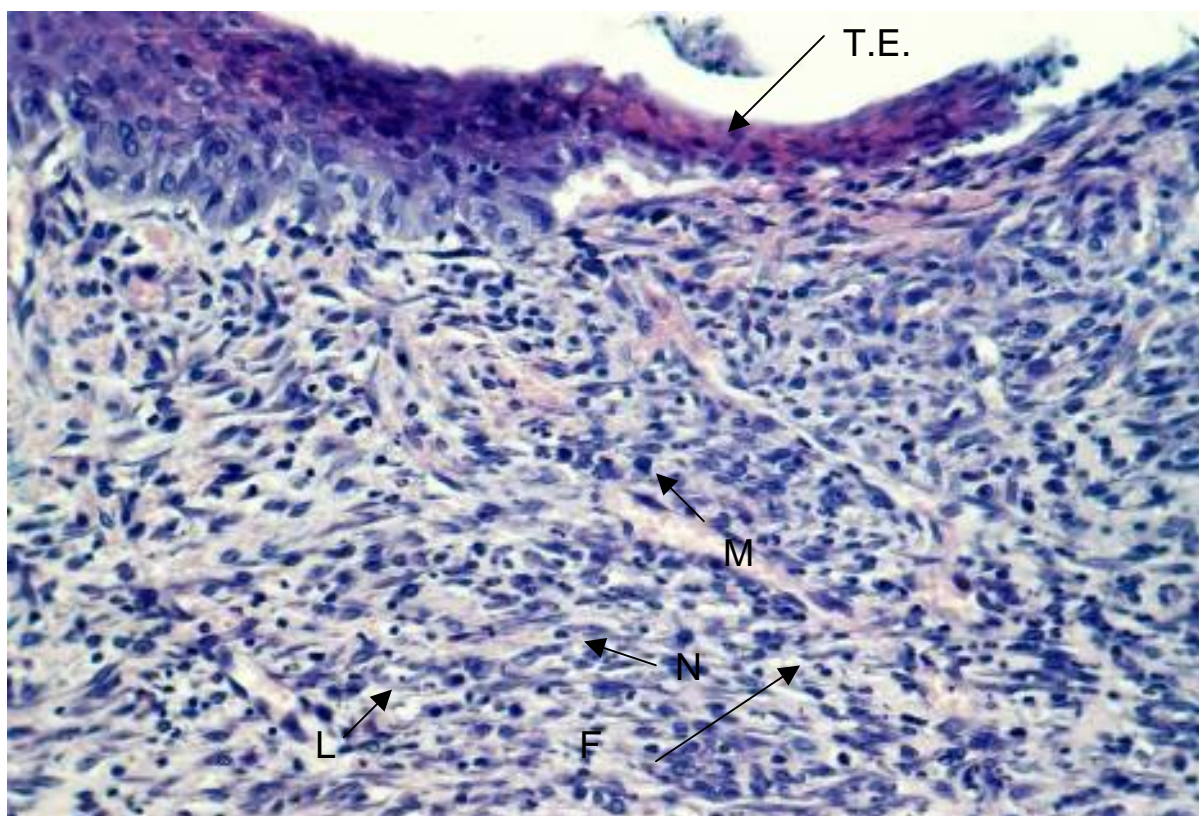


Figura 26. Grupo III (Nicotina) 14 dias. Recobrimento epitelial parcial e pouco diferenciado. Tecido conjuntivo subjacente pouco desenvolvido, observando-se numerosos fibroblastos ao lado de macrófagos e linfócitos. Em direção ao centro da ferida, nota-se área ocupada por polimorfonucleares neutrófilos sobre a superfície da lesão, muitos dos quais em degeneração. Mais profundamente observa-se discreto número de fibroblastos ao lado de macrófagos e linfócitos. H.E. Aumento original 160 X. Tecido epitelial (T. E); fibroblasto (F); macrófagos (M); linfócito (L); neutrófilo (N).

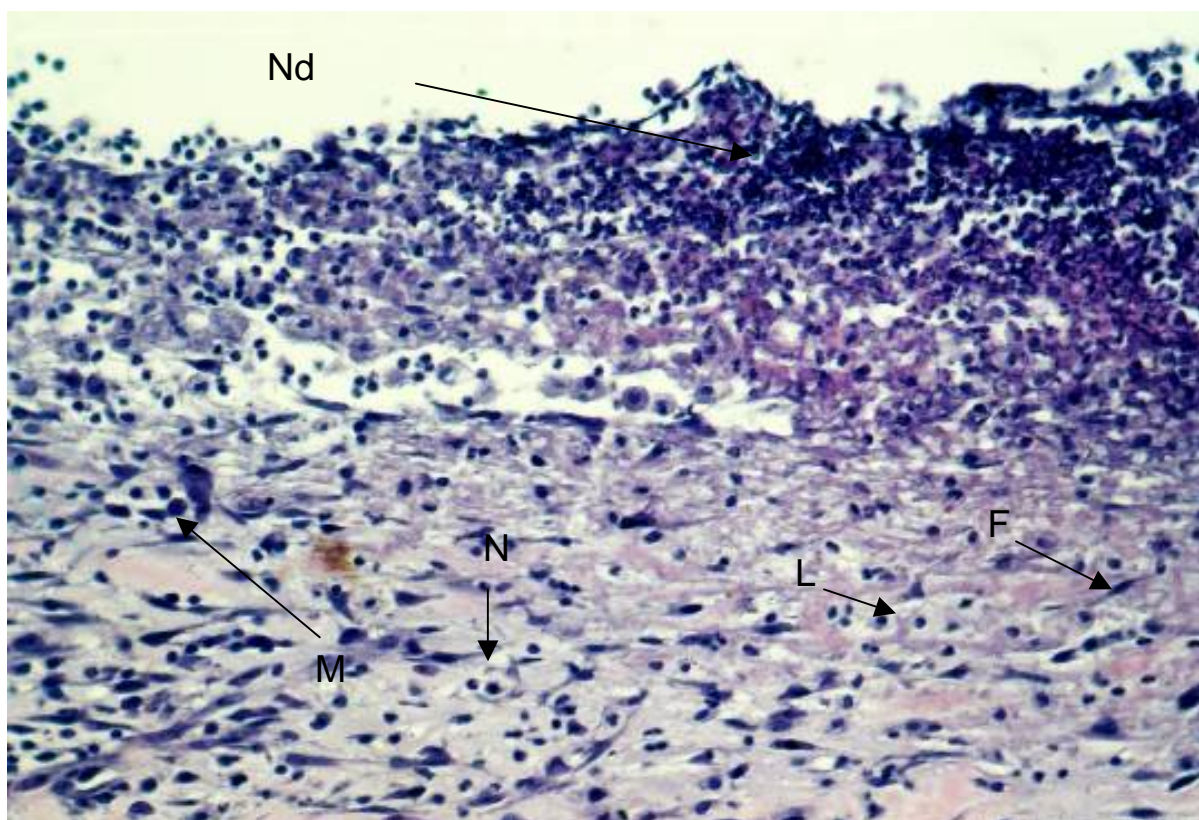


Figura 27. Grupo III (Nicotina) 14 dias. Tecido conjuntivo subjacente pouco desenvolvido, observando-se numerosos fibroblastos ao lado de macrófagos e linfócitos. Em direção ao centro da ferida, nota-se área ocupada por polimorfonucleares neutrófilos sobre a superfície da lesão, muitos dos quais em degeneração. Mais profundamente observa-se discreto número de fibroblastos ao lado de macrófagos e linfócitos. H.E. Aumento original 160 X. Polimorfonucleares neutrófilos em degeneração (Nd); fibroblastos (F); macrófagos (M); linfócitos (L); neutrófilos (N).

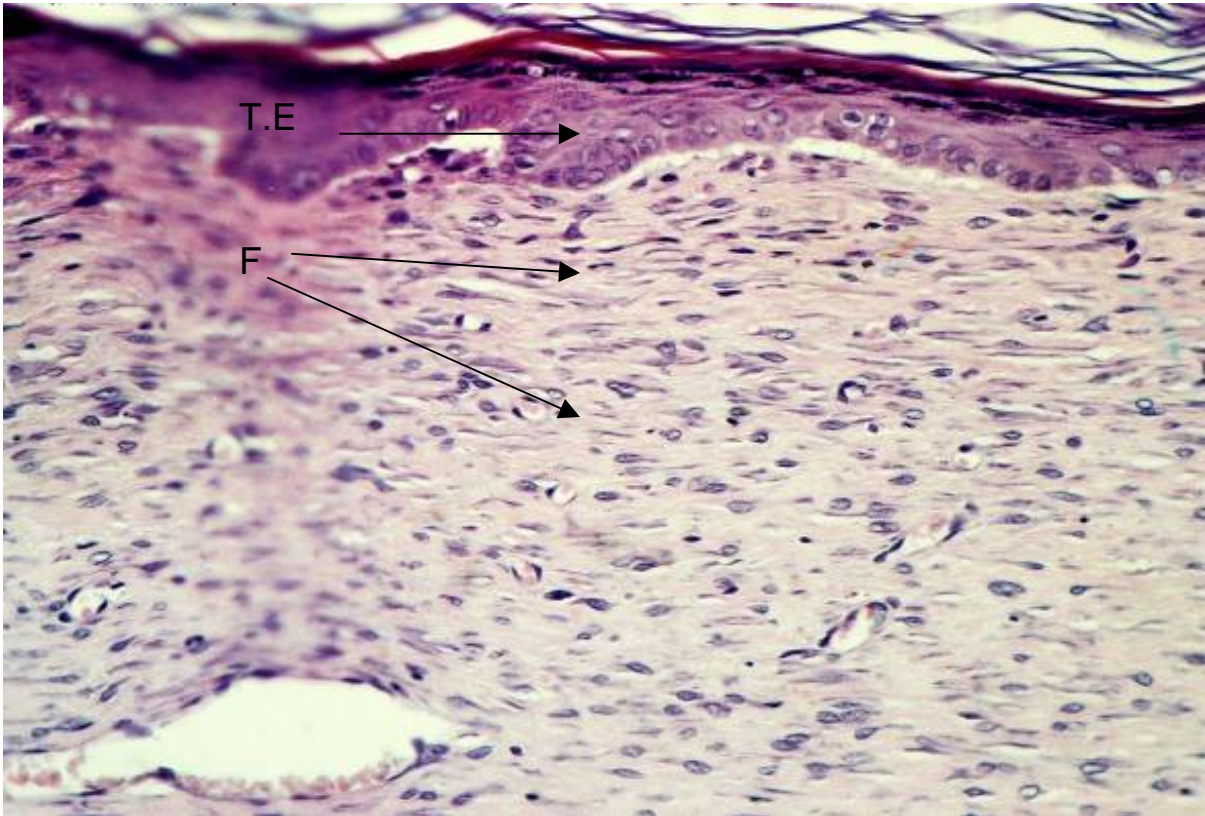


Figura 28. Grupo IV (Nicotina + Laser). 14 dias. O Tecido epitelial recobre a ferida cirúrgica em sua totalidade mostrando-se pouco diferenciado. O Tecido conjuntivo subjacente é bem diferenciado com fibroblastos orientados paralelamente à superfície do epitélio. Nas áreas mais afastadas da borda da ferida, o conjuntivo apresenta maior número de fibroblastos. H.E. Aumento original 160 X. Tecido epitelial (T. E); fibroblasto (F).

Discussão

6 DISCUSSÃO

O estudo dos mecanismos intrínsecos envolvidos na reparação tecidual, associados ao uso do laser em baixa intensidade, tem despertado, nos últimos anos o interesse de muitos pesquisadores (LUCAS et al., 2002; WOODRUFF et al., 2004).

Desta forma, diferentes condições de estudo têm sido apresentadas. Algumas são relacionadas aos parâmetros da irradiação utilizados (tipo de emissor, comprimento de onda, diâmetro do “spot” de saída da luz, distância do feixe da área tratada, potência, fluência, energia, número de aplicações, frequência de tratamento, duração do tratamento, tamanho da ferida tratada) e outras associadas a protocolos de aplicação variados ou modelos experimentais diferentes, proporcionando, conseqüentemente, diferentes respostas biológicas.

A partir do clássico modelo experimental de Mester, apresentado em meados de 1968, no qual duas feridas circulares eram criadas na pele da região dorsal de ratos, sendo uma delas tratada com laser e a outra não tratada (controle), inúmeros pesquisadores contribuíram com pesquisas que abordavam o uso do laser em baixa intensidade na reparação tecidual. Tal modelo ficou consagrado como “modelo de Mester” ou “camundongos de Mester”.

Embora inúmeros trabalhos atestem a efetividade do laser de baixa intensidade sobre os eventos da reparação tecidual (GARCIA, 1992; HALL et al., 1994; LEE et al., 1993; SASAKI; OHSHIRO, 1997), ainda é questionado o modelo clássico de Mester, uma vez que a ferida contra-lateral não tratada poderia também sofrer interferências, via sistêmica, nos processos metabólicos da reparação.

Assim, no presente estudo, que segue a linha de pesquisa de laserterapia em reparação tecidual, do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, foi realizada apenas uma ferida para cada animal, tanto nos do grupo controle quanto nos dos grupos experimentais, priorizando avaliar a resposta biológica da ferida provocada, descartando a possibilidade de interferência de condições sistêmicas advindas de radiações de feridas contra-laterais.

Por outro lado, também optou-se por utilizar no presente estudo o rato, principalmente por ser um animal muito empregado pelos pesquisadores (KOVACS et al., 1974; MESTER; JASZSAGE-NAGY, 1973; MESTER et al., 1971; VILLA, 2001), semelhantemente ao que ocorre com camundongos (LYONS et al., 1987; MESTER et al., 1985; PADILHA et al., 2000), coelhos (REDDY et al., 2003), porco (HUNTER et al., 1984) e, principalmente, por se tratar de um animal de pequeno porte, fácil manuseio cirúrgico, elevada resistência orgânica, além de ser de fácil reprodução, criação e baixo custo,

sem deixar de considerar a quantidade de animais disponíveis para uso no Biotério central da referida Universidade.

Na análise dos resultados obtidos a partir do presente estudo, ficou evidente o efeito da nicotina (Grupo III) sobre os eventos da reparação tecidual evidenciado em todos os períodos experimentais quando comparados com os demais grupos. Por outro lado, a utilização do laser de baixa intensidade, conforme a metodologia utilizada, evidenciou resultados biológicos satisfatórios, atenuando os efeitos indesejáveis da nicotina sobre a reparação tecidual.

Na análise comparativa dos resultados obtidos entre as feridas do Grupo II e as do Grupo I, observou-se que, nas tratadas com laser, houve um estímulo no processo de reparação no tempo de 3 dias, bem como nos períodos subseqüentes. Tal fato corrobora os achados anteriores de outros pesquisadores, que também observaram a efetividade do laser em baixa intensidade sobre os eventos da reparação tecidual (AL-WATBAN et al., 1996; BISHT et al., 1994; GARCIA, 1992; KAMEYA et al., 1995; LEE et al., 1993; LOCCI JR., 2002; LOWE et al., 1998; PESSOA et al., 2004; SILVA NETO et al., 2004; WOODRUFF et al., 2004).

Inúmeros mecanismos de ação tentam elucidar o fenômeno da "fotobiomodulação tecidual. Dentre eles, destaca-se a possibilidade de o laser interferir na metabolização do ácido ascórbico, um dos principais fatores requeridos para a hidroxilação da prolina durante a produção de colágeno

(LABBE et al.,1990). Outra hipótese sugere que o laser atua a nível mitocondrial, promovendo alterações no potencial eletroquímico celular, inferindo no aumento da síntese de ATP dentro da mitocôndria (PASSARELLA et al., 1984), enquanto que Karu (1988) também defende a possibilidade de o mecanismo estar relacionado à ação da energia laser a nível mitocondrial. Segundo esta pesquisadora, ocorre a recepção e absorção da luz a partir de potentes fotoceptores componentes da cadeia respiratória da célula e, a partir desta fotorecepção, as mitocôndrias podem intensificar o metabolismo respiratório e o metabolismo eletrofisiológico da membrana da célula tratada, resultando em um equilíbrio diferenciado da fisiologia celular. Outros acreditam que o laser em baixa intensidade pode interferir positivamente na produção e liberação de fatores de crescimento na área lesada (YU et al., 1994).

Muito embora com a metodologia utilizada no presente estudo não se tenha condições para estabelecer o verdadeiro mecanismo de ação envolvido no processo de bioestimulação do tecido lesado e observado nas feridas do grupo II, relatos na literatura documentam que o laser em baixa intensidade promove: diferenciada proliferação celular (DYSON; YOUNG, 1986; EL SAYED; DYSON, 1990; ENWEMEKA, 1988; MESTER et al., 1985), aceleração da síntese de colágeno e diferenciação mais precoce do tecido de granulação cicatricial (LAM et al., 1986), maior formação de mRNA específicas para a formação de pró-colágenos tipos I e II (SAPERIA et al., 1986), além de aumentar a síntese de ATP dentro das mitocôndrias, ativando linfócitos e

umentando sua habilidade para se ligar a patógenos (COHEN et al., 1998; MESTER et al., 1985; PASSARELA et al., 1984).

Por outro lado, na análise comparativa entre as feridas do grupo III, onde os animais foram tratados com injeção de nicotina, com as do grupo I (controle), no qual os animais receberam injeção de soro fisiológico, são nítidos, em todos os períodos de tempo do experimento, os efeitos indesejáveis daquela sobre o processo de reparação. Dentre os achados observados, destaca-se a presença de crosta, infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos em todos períodos experimentais, evidentes ainda no período de 14 dias, e migração epitelial retardada. Tal fato fortalece os relatos encontrados na literatura que atestam o efeito indesejável da nicotina sobre os eventos da reparação tecidual, em diferentes modelos experimentais (BENATTI et al., 2003; DAFTARI et al., 1994; HOLLINGER et al., 1999; JONES ; TRIPLETT, 1992; MARTINEZ, 2002; NOCITI et al., 2002; PINTO et al., 2002).

Existem muitas hipóteses que tentam esclarecer o mecanismo pelo qual a nicotina interfere negativamente sobre o processo de reparo dos tecidos moles e mineralizados

Tem sido demonstrado que a nicotina interfere na rede vascular, promovendo vasoconstrição da microcirculação (GILMAN et al, 1990; SILVERSTEIN, 1992) e que ela por si só pode atuar diretamente sobre a fisiologia periférica (KWIATKOWSKI et al., 1996). Estudos atestam, ainda dentro da hipótese de vasoconstrição periférica, que a nicotina pode interferir

na liberação de hormônios ou pode atuar diretamente sobre receptores de nicotina presentes na rede ganglionar simpática (KWIATKOWSKI et al., 1996). Outros estudos atestam que, tal mecanismo pode ser explicado pela ação da nicotina em promover a liberação de catecolaminas, promovendo vasoconstrição periférica (NOLAN et al., 1985). Por outro lado, há trabalhos que documentam que a intensidade do efeito vasoconstrictor da nicotina pode inibir a resposta angioblástica durante a revascularização do tecido lesado (DAFTARI et al., 1994).

Se atentarmos para os efeitos indesejáveis observados nas feridas dos animais tratados com nicotina (Grupo III) e compararmos aos resultados do grupo IV, cujos ratos também receberam injeção da droga, observamos que estas evidenciaram processo de reparo mais evoluído. Isto se caracterizou principalmente pela diferenciação do tecido de granulação cicatricial, pela população celular no período de 3 dias, migração epitelial evidente no período de 7 dias e tecido conjuntivo com discreto número de células, o que denota estágio mais adiantado de maturação tecidual, demonstrado no período de 14 dias.

Sem dúvida, tal observação comprova que o laser em baixa intensidade constituiu-se um excelente agente terapêutico coadjuvante para o processo de reparo tecidual. Tal achado vem fortalecer e estimular o uso clínico destes emissores lasers, em especial para os pacientes fumantes, uma

vez que o uso do laser, nos parâmetros utilizados no presente trabalho, promoveu aceleração dos eventos biológicos da reparação.

Embora não possamos atestar o mecanismo pelo qual o laser contribuiu para a bioestimulação das feridas cujos animais receberam nicotina, (Grupo IV), reduzindo seus efeitos sobre os tecidos, podemos inferir que provavelmente o laser, pela sua capacidade de promover angiogênese (GARCIA, 1992), estimular a proliferação celular (DYSON; YOUNG, 1986; EL SAYED; DYSON, 1990; ENWEMEKA, 1988; MESTER et al., 1985), acelerar a síntese de colágeno e promover uma diferenciação mais precoce do tecido de granulação cicatricial (LAM et al., 1986), promover a formação de mRNA específicas para a formação de pró-colágenos dos tipos I e II (SAPERIA et al., 1986), aumentar a síntese de ATP dentro das mitocôndrias, ativando linfócitos e aumentando sua habilidade para ligarem-se a patógenos (COHEN et al., 1998; MESTER et al., 1985; PASSARELA et al., 1984), promoveu um equilíbrio sobre os efeitos indesejáveis da nicotina, o que possibilitou os resultados mais satisfatórios evidenciados no presente estudo.

A literatura demonstra trabalhos que documentam a ação benéfica dos lasers de baixa intensidade sobre os eventos da reparação com emissores lasers, emitido com diferentes comprimentos de onda: quer emissores a gás, de He-Ne, com 632,8 nm (AVERBAKH et al., 1976; BISCHT et al., 1994; IJIMA et al., 1993; LYONS et al., 1987; MESTER et al., 1968, 1971; MESTER, 1973; PESSOA et al., 2004), ou sólidos, de diodo de Arseneto

de Gálio, que emitem na faixa dos 904 nm (ANNEROTH et al., 1988; GARCIA, 1992; HALL et al., 1994) e de Arseneto de Gálio e Alumínio, na faixa dos 635 nm a 830 nm (ARAUJO, 2004; ESPINOSA, 1999; LIMA et al., 2004; LOCCI JR, 2002). No presente estudo foi utilizado emissor laser que emite na faixa de 660 nm, face ao número reduzido de pesquisas que atestem a efetividade deste comprimento de onda sobre os eventos da reparação tecidual (WEEB et al., 1998; YU et al., 1994) muito embora alguns autores não tenham demonstrado a ação benéfica deste (WALKER, 2000).

Aliado à observação anterior, é oportuno esclarecer que vários outros parâmetros terapêuticos merecem ser considerados. Dentre eles, estão o tipo de emissor laser, a dosimetria energética aplicada (dose), a potência de saída do laser, a frequência de tratamento, o diâmetro do “spot” de saída, a distância da área, a área da ferida, o tempo de irradiação, a densidade energética, o intervalo de tratamento, entre outros (WOODRUFF et al., 2004).

Deve-se ressaltar que, muito embora os resultados obtidos no presente estudo sejam motivadores, viabilizando o uso deste recurso no cotidiano da clínica odontológica, principalmente para pacientes fumantes, novos estudos devem ser desenvolvidos para que possam elucidar com maior rigor metodológico os intrínsecos mecanismos da reparação tecidual e, principalmente do uso do laser em baixa intensidade.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Baseado na metodologia utilizada e nos resultados obtidos, parece lícito concluir que:

1. O uso sistêmico da nicotina promoveu retardo do processo de reparo de feridas cutâneas em todos os períodos experimentais.
2. O uso do laser em baixa intensidade, em ratos tratados sistemicamente com soro fisiológico ou nicotina, nos parâmetros utilizados no presente trabalho, promoveu aceleração do processo de reparação tecidual.

Referências

Referências *

ALBERTS, B. et al. Cell-cell adhesion and extracellular matrix. In: ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. eds. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Publ., 1983. p.673-715.

AL-WATBAN, F. A. H.; ZHANG, X. Y. Comparison of the effects of laser therapy on wound healing using different laser wavelengths. *Laser Therapy*, v. 8, n.2 p. 127-35, 1996.

ANNEROTH, G. et al. The effect of low-energy infra-red radiation on wound healing in rats. *J. Oral Maxillofac Surg.*, v. 26, p.12-17, 1988.

ARAUJO, S.R. *Influência da via de administração da droga fotossensibilizadora sobre o processo de reparação em feridas cutâneas tratadas com laser em baixa intensidade*. Estudo histológico em ratos. 2004. 133 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade de Marília, Faculdade de Odontologia, Marília, 2004.

AVERBAKH, M. M. et al. Effect of helium-neon laser on the healing of aseptic experimental wounds. *Eksp. Khir. Anaesteziol.*, Moskva, n. 3, p. 56-9, May/Jun., 1976.

BENATTI, B. B. et al. Stress may enhance nicotine effects on periodontal tissues. An in vivo study in rats. *J. Periodontal Res.*, Copenhagen v.38, n.3, p.351-353, 2003.

BISHT, D.; et al.. Effect of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Indian J. Med. Res.*, New Delhi, v. 100, p. 43-46, Jul.,1994.

*ABNT

BULLOUGH, W.S.; LAURENCE, E.B. Mitotic control by internal secretion: The role of the chalone-adrenalin complex. *Exp. Cell Res.*, New York, v.33, p.176-194, Jan., 1964.

BYRNES K. R. et al. Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in an animal model of type II Diabetes. *Photomedicine and Laser Surg*, Larchmont, v. 22, n.4, p. 281-290, Aug., 2004.

CÉSAR NETO, J. B. et al. A Comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J. Periodontol.* Chicago, v.74. n.10, p. 1454-1458, Oct. 2003.

COLLS, J. *La terapia laser atual*. Barcelona: Centro de Documentación Laser de Meditec, 1984.

COHEN, N. et al. Light irradiation of mouse spermatozoa: stimulation of *in vitro* fertilization and calcium signals. *J. Photochem. Photobiol*, Oxford, v. 68, n.3 p. 407- 413, Sep, 1998.

CONLAN M. J.; RAPLEY J. W.; COBB C. M. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. a review. *J. Clin. Periodontol.*, v. 23, n.5 p. 492-496, May, 1996.

DAFTARI, T. K. et al. Nicotine on the revascularization of bone graft: an experimental study in rabbits. *Spine*, Philadelphia, v.19, n.8, p.904-911, Apr., 1994.

DYSON, M.; YOUNG, S. Effect of laser therapy on wound contraction and cellularity in mice. *Lasers Med. Sci.*, v. 1, p.125-130, 1986.

EL-SAYED, S.O. ; DYSON, M. Comparison of the effect of multi-wavelength light produced by a cluster of semiconductor diodes and of each individual diode on mast cell number and degranulation in intact and injured skin. *Lasers Surg. Med.*, New York, v.10, n.6, p.559-568, 1990.

ENWEMEKA, C. S. Laser biostimulation of healing wounds: specific effects and mechanism of action. *J. Orthop. Sports Phys. Therap.*, v. 9, p.333-338, 1988.

ENWEMEKA, C.S. et al. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. *Photomed Laser Surgery*, Larchmond .v. 22, n.4, p.323-329, 2004.

ESPINOSA, C. R. *Reparação de feridas cutâneas submetidas ao tratamento com laser ou com solução fotossensibilizadora associada ao laser de bioestimulação: estudo histológico em ratos*. Marília, 1999. 98 f. Dissertação (Mestrado em Clínicas Odontológicas)- Universidade de Marília, Faculdade de Ciências Odontológicas. Marília, 1999.

FONTANA, C. Fisiologia da cicatrização de feridas. *Cicatrização*, v.1, n.1, p.3-22, 1996.

FORREST, C.R.; PANG C.Y.; LINDSAY, W.K. Pathogenesis of ischemic necrosis in random-pattern skin flaps induced by long-term low-dose nicotine treatment in the rat. *Plast. Reconstr. Surg.*, Baltimore , v.87, n.3, p. 518-528, Mar. 1991.

GABBIANI, G. The role of contractile proteins in wound healing and fibrocontractive diseases. *Methods Achiev. Exp. Patolh.*, Brasil v.9, p.187-206, 1979.

GABBIANI, G. et al. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J. Exp. Med.*, New York, v.135, n.4, p.719-734, Apr. 1972.

GABBIANI, G.; MONTANDON, D. Reparative process in mammalian wound healing. The role of contractile phenomena. *Int. Rev. Cytol.*, v.48, p.187-219, 1977.

GABBIANI, G.; RYAN, G.B.; MAJNE, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, v.27, n.5, p.549-550, May.1971.

GARCIA, V. G. Comportamento de feridas cutâneas submetidas à ação do Raio Laser: estudo clínico, biométrico e histológico em ratos. Araçatuba, 107 f. Tese (Livre-Docência). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de, Araçatuba. Araçatuba, 1992.

GILMAN, A. et al. editors. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Elmsford, NY: Pergamon Press, 1990. p.180-181,

HALL G. et al. Effect of low level energy laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. *Swed Dent. J.*, v.18, n.1-2, p.29-34, 1994.

HOLLINGER, J. O. et al. Impact of nicotine on bone healing. *J. Biomed. Mater. Res.*, New York, v.45, n.4, p.294-301, Jun. 1999.

HOLM, S.; NACHEMSON, A. Nutrition of the intervertebral disc: acute effects of cigarette smoking: an experimental animal study. *J. Med. Sci.*, Uppsala, v. 93, n.1 p. 91-99, 1988.

HUNTER, J. et al. Effects of low energy laser on wound healing in a porcine model. *Laser Surg. Med.*, New York, v.3, n.4, p.285-290, 1984.

IJIMA. K. et al. Effect of low-power He-Ne laser on deformability of stores human erythrocytes. *Clin. Laser Med. Surg.* New York, v.11, n. 4, p.185-189, Aug.1993.

JENSEN, J. et al. Cigarette smoking decreases tissue oxygen. *Arch. Surg.*, Chicago, v.126, n.9, p.1131-1134, Sep. 1991.

JONES, J. K.; TRIPLETT R. G. The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: A review of evidence and implications for patient care. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, Philadelphia, v.50, n.3, p.237-239, Mar. 1992

KAMEYA, T. et al. Effect of different wavelengths of low level laser therapy on wound healing in mice. *Laser Therapy.*, v. 7, n.1p. 33-36, Mar. 1995.

KAMI T. et al. Effects of low-power diode laser on flap survival. *Ann. Plast. Surg.*, v.14, n.3, p.278-283, Mar. 1985.

KANA, J. S., HUTSCHENREITER, G.; HAINA, D.; WAIDELICH, W. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch. Surg.*, Chicago, v. 116, n.3, p. 293-296, Mar. 1981.

KARU, T., Molecular mechanism of the therapeutic effect of low intensity laser irradiation. *Lasers Life Sci.*, v.2, p.53-74, 1988.

KAUFMAN T. et al. Tobacco smoking: impairment of experimental flap survival. *Ann. Plast.Surg.*, Boston, v. 13, n.6, p.468-472, Dec. 1984.

KOVACS, I. B.; MESTER, E.; GOROG, P. Stimulation of wound healing with laser beam in rat. *Experimentia*, Basel, v.30, n.11, p.1275-1276, Nov.1974.

KWIATKOWSKI, T. C.; HANLEY JUNIOR, E. N., RAMP, W. K. Cigarette smoking and its orthopedic consequences. *Am. J. Orthop*, Houston, v. 25, n.9, p. 590 – 597, Sep. 1996.

LABBE, R. F. et al. Laser photobioactivation mechanisms: in vitro studies using ascorbic acid uptake and hydroxyproline formation as biochemical markers of irradiation response. *Lasers Surg. Med.*, v.10, n.2, p.201-207, 1990.

LAM, T. et al. Low-energy lasers selectively enhance collagen synthesis. *Lasers Life Sciences*, v.1, p. 61- 77, 1986.

LEE, P.; KIM, K.; KIM, K. Effects of low incident energy levels of infrared laser irradiation on healing of infected open skin wounds in rats. *Laser Ther.*, v. 5, p. 59-64, 1993.

LIMA, M. A.; THEODORO, L. H., MILANEZI, L.A.,GARCIA, V. G. A Histologic assessment of the low level therapy associated with photosensitizing drug on impaired wound healing in rats. *Braz. Dent.J.* , v. 15, p. 113-149, 2004.

LIPPER, S.; KAHN, L.B.; REDDICK, R.L. The myofibroblast. *Path. Ann.*, v.15, p.409-449, 1980.

LOCCI, JR. *Efeito da aplicação do laser de baixa potência com variação do comprimento de onda em feridas cutâneas de ratos*. 2002. 135 f. Tese (Mestrado) Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Araçatuba, 2002

LOWE, A. S. et al. Effect of low intensity monochromatic light therapy (890 nm) on a radiation-impaired, wound-healing model in murine skin. *Lasers Surg. Med.*, New York, v. 23, n.5, p. 291-298, 1998.

LUCAS, C. et al. Wound healing in cell studies and animal model experiments by low level laser therapy: Were clinical studies justified? A Systematic Review. *Lasers Med Sci.*, London, v.17, n.2, p.110-134, 2002.

LYONS R.F. et al. Biostimulation of wound healing in vivo by a helium-neon laser. *Ann. Plast. Surg.*, Boston, v.18, n.1, p.47-50, Jan. 1987.

MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature*, v. 187, p. 493-494, 1960.

MARTÍNEZ A. E. T. *Efeito do condicionamento com nicotina e cotinina na morfologia, densidade e viabilidade de fibroblastos. Estudo "in vitro"*. 2002. 97 f. Tese(Mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara , Araraquara. 2002.

MARTINS A. G. et al. Smoking May Affect Root Coverage Outcome: A Prospective Clinical Study in Humans. *J. Periodontol.*, Chicago, v.75, n.4, Apr. 2004.

MESTER, E. et al. Stimulation of wound healing by means of laser rays. III. Investigation of the effect on immune competent cells. *Acta Chir. Acad. Sci. Hung.*, Budapest, v. 19, n.2, p. 163-170, 1978.

MESTER, E. et al. The stimulating effect of low power laser rays on biological systems. *Laser Rev.*, Budapest, v. 1, p. 3, 1968.

MESTER, E. et al. S. Laser stimulation of wound healing. *Acta Chir. Acad. Sci. Hung.*, Budapest, v. 17, n.1, p. 49-55, 1976.

MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENDE, B.; TOTA, J.G. Effect of Laser rays on wound healing. *Am J. Surg.*, New York, v. 122, n.4, p. 532-535, 1971.

MESTER, S. Stimulation of wound healing by means of laser rays: clinical and electron microscopical study. *Acta Chir. Acad. Sci. Hung.*, Budapest, v. 14, n. 4, p. 347-354, 1973.

MESTER, S.; JASZSAGI-NAGY, E. The effect of laser radiation on wound healing and collagen biosynthesis. *Stud. Biophys.*, v. 35, p. 227-30, 1973.

MESTER, E.; MESTER, A .F.;MESTER, A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg. Med.* New York, v.5, n.1, p.31-39, 1985.

MISERENDINO, L. J.; PICK, R. M. *Laser in dentistry*. Chicago. Quintessence. 1995. 247p.

MONTANDON, D.; D'ANDIRAN, G.; GABBIANI, G. The mechanism of wound contraction and epithelialisation. *Clin. Plast. Surg.*, Philadelphia, v.4, n.3, p.325-346, 1977.

MOSELY, L. H., FINSETH, F. Cigarette smoking: impairment of digital blood flow and wound healing in the hand. *Hand*, Livingstone, v. 9, n. 2, p.97-101, 1977.

NEIBURGER, E. J. The effect of low power lasers on intraoral wound healing. *N.Y. State Dent. J.*, Albany, v. 61, n.3, p. 40-43, 1995.

NOCITI, F. H .JR. et al. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J. Periodontol.*, Chicago, v. 73, n.9, p.982-987, 2002a.

NOCITI, F. H. JR. et al. Nicotine and bone density around titanium implants: A histometric study in rabbits. *Implant Dent*, Baltimore, v. 11, n. 2, p. 176-182, 2002b.

NOLAN, J. et al. The acute effects of cigarette smoke exposure on experimental skin flaps. *Plast.Reconstr. Surg.*, Baltimore, v. 75, n.4, p. 544-551, Apr.1985.

OKAMOTO, M. et al. Effects of aging on acute toxicity of nicotine in rats. *Pharmacol. Toxicol.*, Copenhagen, v.75, n.1, p. 1-6, Jul. 1994.

PADILHA, D. M. P. et al. Reparo de feridas na língua de camundongos jovens e velhos. *Rev. Fac. Odontol.,Porto Alegre*, v.41, n.1, p.66-69,Jul. 2000

PALMER, R.M.; SCOTT, D.A.; MEEKIN, T.N.; POSTON, R.N.; ODELL, E.W.; WILSON, R.F. Potential mechanisms of susceptibility to periodontitis in tobacco smokers. *J. Periodont. Res.*, Copenhagen. v.34, n.7, p.363-369, Oct. 1999.

PAPANTONOPOULOS, G.H. Effect of Periodontal Therapy in smoker and non-smokers with advanced periodontal disease: results after maintenance therapy for a minimum of 5 years. *J. Periodontol.*, Chicago,v.75, n.6, p.839-843,Jun. 2004.

PASSARELA, S. et al. Increase of proton eletrochemical potential na ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated *in vitro* by helium-neon laser. *Febs lett.*, v.175, p.95-97

PEACOCK, E.E.; VAN WINKLE, W. Wound repair. Philadelphia: W.B. Saunders, 1976.

PEACOCK, M. E. et al. The effect of nicotine on reproduction and attachment of human gingival fibroblasts in vitro. *J. Periodontol.*, Chicago, v. 64, p. 658-665, 1993.

PERSSON, L.; BERGSTROM, J.; GUSTAFSSON, A. Effect of tobacco smoking on neutrophil activity following periodontal surgery. *J. Periodontol.* Chicago, v.74, n.10, p.1475-1482, Oct. 2003.

PESSOA E. S. et al. A histological assessment of the influence of low-Intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. *Photomed Laser Surg.*, Larchmont, v. 22, n. 3, p.199-204, Jun. 2004.

PINTO, J. R.; BOSCO, A. F.; OKAMOTO, T.; GUERRA, J. B.; PIZA, I. G. Effects of Nicotine on H of Extraction Sockets in Rats. A Histological Study. *Braz. Dent. J.*, Ribeirão Preto, v.13, n.1, p.3-9, 2002.

POLLACK, S.V. Wound healing: a review .The biology of wound healing. *J. Dermatol. Surg. Oncol.*, New York, v.5, n.5, p.389-393, May. 1979.

RAULIN, L. A. et al. The effect of nicotine on the attachment of human fibroblast to glass and human root surfaces in vitro. *J.Periodontol.*, Chicago, v.59, n.5, p. 318-325, May. 1988.

REDDY G.K. et al., Comparison of the Photostimulatory Effects of Visible He-Ne and Infrared Ga-As Laser on Healing Impaired Diabetic Rat Wounds. *Lasers in Surg. Med.*, New York, v.33, n.5p.344-351, 2003.

ROBBINS, S.L; COTRAN, R.S; KUMAR, V. Pathologic basis of diseases. 3rd. Philadelphia: W.B. Saunders, 1984. p.40-84.

ROSS, R. The fibroblast and wound repair. *Biol. Rev.,Camp. Philos. Soc.*, London, v.43, n.1, p.51-96, Feb.1968.

RUDOLPH, R. et al.The life cicle of the myofibroblast. *Surg. Gynecol. Obstet.*, Chicago, v.145, n.3, p.389-394, Sep. 1977.

RUNGGER-BRANDLE, E; GABBIANI, G. The role of cytoskeletal and cytocontractile elements in pathologic processes. *Am. J.Pathol.*, Philadelphia, v.110, n.3, p.361-392, Mar. 1983.

RYAN, G.B; MAJNE, G. Acute inflamation: A review. *Am. J. Pathol.*, Philadelphia, v.86, n.1, p.183-276, 1977.

SALDANHA, J. B. et al. Guided Bone Regeneration may be negatively influenced by Nicotine Administration: a histologic Study in dogs. *J. Periodontol.*,Chicago, v. 75, n. 4., p.565 - 571, Apr. 2004.

SAPERIA, D., GLASSBERG, E., LYONS, R. F.et al. Demonstration of elevated type I and type III procollagen mRNA levels in cutaneous wounds treated with Helium-neon laser. Proposed mechanism for enhance wound healing. *Biochem. Biophys. Res. Commum.*, New York,v.138, n.3, p.1123-1128, Aug. 1986.

SASAKI, K.; OHSHIRO, T. Assesement in the rat model of the effects of 830 nm diode laser irradiation in a diachronic wound healing study. *Laser therapy*.v.9, p.25-32, 1997.

SILVA NETO et al. Evaluation of the Use of Low Level Laser and Photosensitizer Drugs in Healing. *Lasers Surg Med*, New York, v.34, n.5, p.451-457, 2004.

SILVERSTEIN P. Smoking and wound healing. *Am. J. Med.*, New York, v.15, n.93(1A), p.22S-24S, Jul, 1992.

SOARES, J. H. et al. Aspectos morfológicos e histométricos da reparação tecidual das feridas cutâneas de ratos após irradiação com o laser de hélio-neônio. *Acta Cir. Bras.*, v. 4, n. 2, p. 56-60, 1989.

STRANG, R.; MOSELEY, H.; CARMICHAEL, A. Soft-lasers: have they a place in dentistry? *Brit. Dent. J.*, London, v. 165, n.6, p. 221-225, Sep.1988.

SWEET, J. B., BUTLER, D. P. The relationship of smoking to localized osteitis. *J. Oral Surg.*, v. 37, n. 10, p. 732-735, Oct. 1979.

TAYLOR, P. Agentes que atuam na junção neuromuscular e nos gânglios autônomos. In: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L.E. *Goodman e Gilman; As bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed., México: McGraw-Hill, 1996. p. 118-145

van ADRICHEM, L.N.; HOEGEN, R., HOVIUS, S.E.; KORT, W.J.; van STRIK, R.; VUSEVS, V.D.; van der MEULEN, J.C. The effect of cigarette smoking on the survival of free vasculaz and pedicled epigastric flaps in he rats. *Plast. Reconstr. Surg.*, Baltimore, v.97, n.1, p. 86-96, Jan. 1996.

VILJANTO, J. Biochemical basis of tensile strength in wound healing. An experimental study with viscose cellulose sponges on rats. *Acta Chir. Scand.*, v.127, p.1-101, 1964.

VILLA, M.L. Processo de cura de feridas cirúrgicas provocadas no dorso de animais quando submetidos à ação dos medicamentos: Soro fisiológico, água oxigenada, anestésicos xylestesin, novocol e adrenalina. Estudo Histológico *em ratos*. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Odontológicas-Marília .106 fls. , 2001.

WALKER, M.D. Effect of low intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound healing model in murine skin. *Lasers Surg. Med.*, New York, v.26, n.1, p.41-47, 2000.

WEBB, C.; DYSON, M.; LEWIS, W.H.P. Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar derived fibroblasts: possible mechanisms for increase in cell counts. *Lasers Surg. Med.*, New York, v.22, n.5, p.294-301, 1998.

WOODRUFF L. D.; JULIE M. B; WINDY M.B; KENNETH S. D. JR.; CAMERON D. B; DONNA L. W;. ENWEMEHKA C.S. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg.*, Larchmont, v.22, n.3, p.241-247, Jun. 2004.

YU, W.; NAIM, J. O.; LANZAFAME, R.J. The effects of photo-irradiation on the secretion of TGF and PDGF from fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Medic.*, New York, suppl. 6, 1994.