



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



GUSTAVO SIVIERI DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO EFEITO DO LASER DE
BAIXA INTENSIDADE NA RESPOSTA DO TECIDO
CONJUNTIVO AO CIMENTO ENDOFILL**

ARARAQUARA

2008



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



GUSTAVO SIVIERI DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO EFEITO DO LASER DE
BAIXA INTENSIDADE NA RESPOSTA DO TECIDO
CONJUNTIVO AO CIMENTO ENDOFILL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do Título de Doutor em Endodontia.

Orientador:

Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert

ARARAQUARA

2008

Araújo, Gustavo Sivieri de.

Avaliação histológica do efeito do laser de baixa intensidade na resposta do tecido conjuntivo ao cimento Endofill / Gustavo Sivieri de Araújo. – Araraquara: [s.n.], 2008.

84 f. ; 30 cm.

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

Orientador : Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert

1. Endodontia 2. Cimento de óxido de zinco e eugenol
3. Lasers 4. Tecido conjuntivo 5. Mastócitos 6. Fibrose I. Título.

Gustavo Sivieri de Araújo

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO EFEITO DO LASER DE
BAIXA INTENSIDADE NA RESPOSTA DO TECIDO
CONJUNTIVO AO CIMENTO ENDOFILL**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert

2º Examinador: Profa. Dra. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho

3º Examinador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho

4º Examinador: Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

5º Examinador: Profa. Dra. Yara Teresinha Correa Silva Sousa

Araraquara, 27 de março de 2008.

Dados Curriculares

Gustavo Sivieri de Araújo

- Nascimento** 08/03/1972 - Uberaba - MG
- Filiação** Carlos Francisco de Araújo
Cecília Maria Sivieri de Araújo
- 1991/1995** Curso de Graduação em Odontologia
Universidade de Uberaba (UNIUBE) - Uberaba-MG
- 1997/1997** Curso de Atualização em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- (FOAr-UNESP) - Araraquara-SP
- 1998/1999** Curso de Especialização em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- (FOAr-UNESP) - Araraquara-SP
- 2000/2000** Curso de Atualização (Nivelamento) em Patologia Geral
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - Faculdade de Medicina (FM-UFTM) - Uberaba-MG
- 2004/2008** Curso de Pós-Graduação em Endodontia - Doutorado
Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- (FOAr-UNESP) - Araraquara-SP
- Associações** IADR - International Association for Dental Research
SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

“Atrás de cada vitória, sempre existe um grande sacrifício.

Tudo exige persistência, coragem e dedicação,

para que o sonho possa se concretizar!”

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese...

Aos meus **pais, Cecília e Carlos**, vocês são meu maior exemplo de vida. Vocês que sempre: estiveram ao meu lado, foram meu porto seguro, me apoiaram e incentivaram incondicionalmente em minhas decisões, me estimularam a continuar minha caminhada, nunca mediram esforços para que meus sonhos se concretizassem. Tudo que sou devo a vocês, que sempre acreditaram em mim. Hoje vocês colhem um pouco do que tanto lutaram e batalharam para minha formação como filho, como pessoa, e como profissional. Obrigado pela educação que recebi e por tudo que me ensinaram e me passaram de exemplo de vida, caráter, honestidade, responsabilidade, dignidade. Fica até difícil expressar por palavras o que vocês representaram para mim... Este momento não é só meu, é nosso!!! Meu muito obrigado por tudo!!! AMO MUITO VOCÊS!!!

A minha **irmã Adriana**, pela convivência e amor que sempre tivemos, pelo apoio e incentivo de sempre, principalmente nas horas em que mais precisei. Você sempre me ajudou seja pelas palavras e/ou gestos de carinho e conforto que sempre me ajudaram a buscar forças para seguir meu caminho e vencer obstáculos para realizar meus sonhos e objetivos. Tenho certeza, que deve estar orgulhosa no dia de hoje e você também faz parte desta história!!!

Ao meu **irmão Marcelo**, pela convivência e amor que sempre esteve presente em minha vida, acreditando e confiando em mim. Saiba que você é um dos responsáveis pela

minha escolha profissional e também pelas influências recebidas de você em seguir a carreira acadêmica, afinal somos além de irmãos cirurgiões-dentistas e professores. Obrigado pelo apoio, carinho e incentivo nos meus primeiros passos na Odontologia, seja como aluno e depois como profissional. Você também participou desta conquista e desta fase que concluo hoje!!!

Aos meus **sobrinhos, Thiago, Thaíssa, Samuel e Mariana** e meus **cunhados, Antônio José e Janeide**, pelo apoio, carinho, amor, incentivo, conselhos, amizade sempre presentes em todos os momentos!!!

Aos meus **4 eternos avós (in memorian)**, que foram os responsáveis pela formação de toda nossa família, que sempre foram exemplos de vida, trabalho, perseverança, honestidade e orgulho para nós. Vocês construíram nossa árvore genealógica, me sinto orgulhoso de ser um ramo desta.

À **todos meus familiares**, que de alguma forma contribuíram para minha formação como pessoa e pela colaboração de alguma forma dessa vitória e conquista no dia de hoje!!!

A TODOS VOCÊS DEDICO ESTE TRABALHO!!!

MINHA ETERNA E SINCERA GRATIDÃO...

ESTA VITÓRIA NÃO É SÓ MINHA É NOSSA!!!

**“Que um verdadeiro amigo vai conosco até o fim.
Que o silêncio muitas vezes fala mais de mil palavras.
Que nada é mais aconchegante do que um caloroso abraço.”**

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço esta Tese...

À **Deus**, pelo dom de viver e pela sua constante presença em minha vida, orientando e iluminando os caminhos a serem seguidos, ouvindo as minhas preces, me acolhendo e dando a luz tão imprescindível nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert**, pela orientação, atenção, ensinamentos e confiança em todos estes anos de convívio depositados em mim. Pelo apoio, amizade que foram fundamentais para realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho**, pela amizade, pelas valiosas orientações e ensinamentos repassados, atenção e confiança, pelos conselhos e experiências de vida profissional, de docência e pesquisa transmitidos neste período de convivência.

À **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita - UNESP**, na presença de seu Magnífico Reitor **Prof. Dr. Marcos Macari** e Vice-Reitor, **Prof. Dr. Herman Jacobus Cornelis Voorwald**.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - (FOAr - UNESP)**, nas pessoas de sua atual

Diretora, **Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio**, e seu Vice-Diretor, **Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla**, por todas as oportunidades oferecidas para a realização de minha Pós-Graduação, desse trabalho de Tese e de todos os outros trabalhos de pesquisa em que tive oportunidade de participar.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Endodontia da FOAr-UNESP**, na pessoa de seu atual **Coordenador, Prof. Dr. Mário Tanomaru-Filho**, por sempre se mostrar uma pessoa serena, atencioso, amigo e incentivador da vida, do ensino, da docência e da pesquisa.

Ao **Departamento de Odontologia Restauradora**, principalmente aos **Profs. Drs. da Disciplina de Endodontia da FOAr-UNESP: Mário Roberto Leonardo, Roberto Miranda Esberard, Idomeo Bonetti-Filho, Mário Tanomaru-Filho, Renato de Toledo Leonardo, Fábio Luiz Camargo Villela Berbert e Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos, amizade, atenção, incentivo e orientações nas aulas, seminários, clínicas, Tese e todas as pesquisas durante todos estes anos, que contribuíram para minha formação profissional como docente e pesquisador. Gostaria que soubessem que eu sinto muito orgulho de ter sido aluno de vocês desde meu Curso de Atualização em 1997, chegando até hoje na conclusão do Curso de Doutorado. Agradeço também por me darem a oportunidade de realizar este meu sonho pessoal e profissional, se hoje sou um verdadeiro Discípulo da Endodontia da FOAr-UNESP, devo esta formação que obtive de vocês. Eu cresci muito com vocês e espero tê-los como eternos amigos e Mestres!!!

À **Universidade de Uberaba - UNIUBE**, nas pessoas das **Profas. Dras. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues e Sanívia Aparecida Lima Pereira, da Disciplina de Patologia do Curso de Odontologia**, pela amizade, incentivo, confiança e pela oportunidade ímpar da realização de parte desta Tese em seu laboratório.

Ao **Prof. Dr. Jayme Maurício Leal (*in memorian*)**, pelos ensinamentos e aprendizados que obtive por sua pessoa, durante o meu Curso de Especialização na Endodontia da FOAr-UNESP, pela convivência maravilhosa e simplicidade que nos encantava. Esteja onde estiver, levarei comigo os conhecimentos recebidos e suas sábias palavras!!!

Ao **Prof. Dr. Homero Habel Rodrigues (*in memorian*)**, sua presença se faz sentir, mesmo na sua ausência sem fim... Seus ensinamentos, ideais e profissionalismo, como suas orientações, tornaram-se presentes, onde os fatos, o mundo e as pessoas adquirem sentido. Que o mistério de cada um seja sempre um convite a contemplar sua presença sobre a terra. Se hoje concluo este sonho da Pós-Graduação, o Senhor tem uma grande responsabilidade e parcela na minha decisão certa de seguir a carreira acadêmica, por meio das inúmeras conversas, conselhos e ensinamentos de experiências de vida, docência e pesquisa que me delineou, mudando minha maneira de pensar, enquanto fui seu estagiário. Na eterna saudade, a minha gratidão!!!

Aos **Docentes do Departamento de Morfologia, Disciplina de Histologia da FOAr-UNESP, Profas. Dras. Lizeti, Eleny, Estela e ao Prof. Dr. Paulo**, pela amizade e enorme contribuição nesta Tese.

À **Profa. Dra. Rosane de Fátima Zanirato Lizarelli, IFSC-USP - São Carlos-SP**,
pela amizade e contribuição nos ensinamentos em sua Disciplina de Laser em Odontologia.

Aos **colegas do Curso de Pós-Graduação em Endodontia da FOAr-UNESP**, das turmas novas e antigas de Mestrado e Doutorado: **Adriana, Alexandre, Anderson, Arnaldo, Bier, Cláudia, Cristiane, Denise, Eduardo, Erick, Erica, Fabíola, Fernanda, Fernando (Tander), Fernandão, Fernandinho, Fred, Freddy (peruano), Guilherme (X), Henrique (in memorian), Hugo, José Carlos (mexicano), Júlio Cezar (colombiano), Marco Aurélio, Maurício (equatoriano), Norberto, Paula, Regina, Renata, Renatinho, Ronaldo, Santiago, Sérgio e Vivian**, pela convivência, aprendizado, amizade e bons momentos vividos.

Ao **colega do Curso de Pós-Graduação em Endodontia da FOAr-UNESP Henrique (in memorian)**, que nos deixou no ano passado...descanse em paz na morada eterna amigo...

Aos **grandes amigos, Bier, Eduardo, Norberto**, obrigado por terem sido amigos de verdade, por todos os bons momentos compartilhados comigo, as conquistas, experiências e oportunidades tanto em nossa Pós-Graduação, quanto nas horas de lazer e descontração. Por sempre estarem dispostos a ajudar e pela vontade de quererem crescer juntos na Endodontia. Vocês foram meus verdadeiros irmãos em Araraquara. Espero que nossas amizades não se percam e possamos vencer as barreiras da distância e do tempo, e que tenhamos oportunidades de realizar muitas atividades de ensino e pesquisa juntos ao longo de nossas vidas.

Aos **colegas dos outros Programas de Pós-Graduação da FOAr-UNESP**, pela amizade e convivência nestes anos.

Aos **colegas pós-graduandos do laboratório do Departamento de Morfologia, Disciplina de Histologia da FOAr-UNESP, Ana Paula, Frank, Hermes, Rubens e Simone** pela amizade, convivência e ajuda no laboratório.

Aos **funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da FOAr-UNESP**, em especial à **Célinha, Creusa, Pedro, Marinho, Adriana, Cida, Conceição**, pelo convívio amigo, atenção que sempre me dispensaram e atendimento sempre eficiente e cordial.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação da FOAr UNESP, Rosângela, Alexandre, Flávia**, e em especial a **Mara** pela amizade, educação, carinho e respeito com que sempre me trataram.

À **Diretora da Biblioteca da FOAr-UNESP, Maria Helena**, pela amizade, conselhos e orientações na organização desta Tese e de outros trabalhos de pesquisa, assim como agradeço aos **funcionários da Biblioteca, Adriano, Ceres, Eliane, Maria Inês, Marley, Odete, Silvia**, os quais sempre me atenderam com muita atenção, educação e amizade.

Aos **funcionários do Departamento de Morfologia, Disciplina de Histologia da FOAr-UNESP, Pedrinho e Luiz** pela acolhida e ajuda nestes anos.

À pós-graduanda e também funcionária do Laboratório de Patologia do Curso de Odontologia da UNIUBE, Polyanna Miranda Alves, pela contribuição na realização de parte das lâminas desta Tese.

Aos **animais de laboratório** que foram imprescindíveis para realização desta Tese.

À **CAPES** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

À Empresa **DMC**, que generosamente nos emprestou o aparelho de laser utilizado nesta Tese.

A **todos as minhas amigas e amigos de Uberaba**, que de alguma forma me acompanharam nesta minha trajetória dos últimos anos.

À **todas as pessoas que de alguma forma direta ou indireta citados aqui ou não**, colaboraram e contribuíram na minha formação durante estes 4 anos tornando possível a realização deste sonho de realizar minha Pós-Graduação...

**...A MINHA ETERNA
E SINCERA GRATIDÃO
E O MEU MUITO OBRIGADO!!!**

*“Determinação, coragem e autoconfiança
são fatores decisivos para o sucesso.*

*Não importam quais sejam os
obstáculos e as dificuldades.*

*Se estivermos possuídos de uma
inabalável determinação,
conseguiremos superá-los.*

*Independentemente das circunstâncias,
devemos ser sempre humildes,
recatados e despidos de orgulho.”*

Dalai Lama

**“As dificuldades muitas vezes, ensinam grandes lições,
e que o medo nunca nos atrapalhe de executar grandes projetos.”**

SUMÁRIO

SUMÁRIO

PREFÁCIO	17
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	18
RESUMO	20
ABSTRACT	22
INTRODUÇÃO	24
PROPOSIÇÃO	33
CAPÍTULO 1	35
CAPÍTULO 2	57
CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	77
ANEXOS	83

PREFÁCIO

Esta Tese foi dividida em dois Capítulos, que correspondem a dois artigos científicos, intitulados:

- 1) **“Efeito do laser de baixa intensidade na resposta tecidual ao implante de cimento Endofill”**

Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Photomedicine and Laser Surgery*

- 2) **“Quantificação de fibrose e mastócitos na resposta do tecido conjuntivo ao cimento Endofill irradiado por laser de baixa intensidade”**

Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Lasers in Medical Science*

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADA - American Dental Association

ANSI/ADA - American National Standards Institute/American Dental Association

AsGaAl - Arseneto de Gálio Alumínio

CEEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

D - Dose ou densidade de energia ou fluência de energia

E - Energia

HE - Hematoxilina e Eosina, Hematoxylin and Eosin

Hertz - Hz

HILT - High Intensity Laser Treatment

InGaAlP - Índio Gálio Alumínio Fósforo

ISO - International Organization for Standardization

J - Joule

J/Cm² - Joule por centímetro quadrado

LASER - Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação, Light Amplification
by Stimulated Emission of Radiation

LBI - Laser de baixa intensidade

LILT - Low intensity laser therapy

LIV - LBI infravermelho

LLLT - Low level laser therapy

LV - LBI vermelho

M/mm² - Mastócitos por milímetro quadrado

MASER - Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation

MC - Mast cells

MMP-2 - Matriz de Metalloproteinase-2

MTA - Mineral trióxido agregado

mW - MiliWatts

OZE - Cimento de óxido zinco e eugenol

P - Potência

TM - Tricrômico de Masson, Masson Trichrome

ZOE - Zinc oxide and eugenol sealer

λ - Comprimento de onda

μm - Micrômetros

ηm - Nanômetro

**“Tudo que nos acontece nos traz experiência
ou desenvolve alguma qualidade que nos faltava”**

Sakarawa

RESUMO

Araújo GS. Avaliação histológica do efeito do laser de baixa intensidade na resposta do tecido conjuntivo ao cimento Endofill [tese doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi realizar uma avaliação histológica do efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos ao implante dos tubos contendo cimento de óxido zinco e eugenol (OZE) Endofill, que foram irradiados imediatamente e 24 horas após o implante dos tubos. Foram utilizados sessenta camundongos (*Mus musculus albinus*), distribuídos em 3 grupos (n=20): GI (controle), os animais receberam implante do tubo de polietileno com Endofill e não receberam a irradiação LBI; GII implante do tubo com Endofill e irradiação LBI vermelho (InGaAlP), $\lambda 685\text{nm}$, $D=72\text{J}/\text{Cm}^2$, $E=2\text{J}$, $T=58\text{s}$, $P=35\text{mW}$; GIII implante do tubo com Endofill e irradiação LBI infravermelho (AsGaAl), $\lambda 830\text{nm}$, $D=70\text{J}/\text{Cm}^2$, $E=2\text{J}$, $T=40\text{s}$, $P=50\text{mW}$. Os animais foram mortos nos períodos de 7 e 30 dias, os blocos de tecido foram seccionados com de $6\mu\text{m}$ de espessura e as lâminas foram coradas com: Hematoxilina e Eosina/Tricrômico de Masson, com o propósito de verificar as reações teciduais; Picrosírius para identificar o padrão de fibrose e Azul de Toluidina para quantificar os mastócitos. Os resultados foram analisados ao microscópio óptico comum e de luz polarizada para a fibrose. A análise estatística realizada foi quali-quantitativa. A ação do LBI sobre o tecido conjuntivo diminuiu o efeito irritante oferecido pelo cimento Endofill, no período pós-operatório de 7 dias ($P>0,05$). Aos 30 dias ocorreu reparo tecidual, independente da irradiação do LBI. A irradiação LBI não ofereceu melhoria no padrão de fibrose, e proporcionou queda significativa de mastócitos independente do período estudado.

Palavras-chave: Endodontia; cimento de óxido de zinco e eugenol; lasers; tecido conjuntivo; mastócitos; fibrose.

“E preferível a angústia da busca do que a paz da acomodação”

Marisa de Toledo Leonardo

ABSTRACT

Araújo GS. Histological evaluation of the effect of the low level laser therapy in the response of the conjunctive tissue to the Endofill sealer [tese doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

ABSTRACT

The aim of the present study was to perform a histological evaluation of the effect of the low level laser therapy (LLLT), in the response of the subcutaneous conjunctive tissue of mice to the tubes implant with to the zinc oxide and eugenol sealer (ZOE) Endofill, that were immediately irradiated and again 24h after the implant of the tubes. Sixty mice (*Mus musculus albinus*) were used, distributed into 3 groups (n=20): GI (control), the animals received the polyethylene tube implant with the Endofill and no LLLT irradiation; GII, tube implant with the Endofill and red LLLT irradiation (InGaAIP), $\lambda 685\text{nm}$, $D=72\text{J}/\text{Cm}^2$, $E=2\text{J}$, $T=58\text{s}$, $P=35\text{mW}$; GIII, tube implant with the Endofill and infrared LLLT irradiation (AsGaAl), $\lambda 830\text{nm}$, $D=70\text{J}/\text{Cm}^2$, $E=2\text{J}$, $T=40\text{s}$, $P=50\text{mW}$. The animals were killed after 7 and 30 days; the blocks of tissue were cut into serial $6\mu\text{m}$ thick sections and glass slides were stained with: Hematoxylin and Eosin/with Masson Trichrome, in order to verify the tissue reactions; Picrosírius, to identify the fibrosis rate and Toluidine Blue, to quantify mast cells (MC). The results were analyzed through the normal use optical microscope and a polarized light one for fibrosis. The statistical analysis carried out was quali-quantitative. The action of the LLLT on the connective tissue reduced the irritating effect produced by the Endofill sealer, at the post-operative period of 7 days ($P>0,05$). In 30th days there was tissue repair independent of the irradiation of LLLT. The LLLT irradiation didn't offer an improvement of the fibrosis rate, and provided a significant fall in the concentration of MC independent of the studied period.

Keywords: Endodontics; zinc oxide and eugenol sealer; lasers; connective tissue; mast cells; fibrosis.

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre recomeçando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...”

Fernando Pessoa

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A Endodontia em decorrência do seu desenvolvimento técnico-científico é considerada como um dos mais importantes ramos da Odontologia, chegando a atingir elevados índices de sucesso, refletindo ao profissional da área a resolução da maior parte dos casos clínicos.

Uma das principais finalidades da terapia endodôntica é a remoção dos agentes físicos, químicos ou biológicos que são prejudiciais aos tecidos apicais e periapicais, permitindo assim que o organismo recupere sua condição de normalidade fisiológica reparando os tecidos lesados (Leonardo²⁵, 2005).

De acordo com os princípios técnicos e biológicos que regem a Endodontia atual, todas as fases do tratamento endodôntico devem ser vistas com a mesma atenção e importância, por serem considerados atos operatórios interdependentes. Alguma falha em uma das etapas inevitavelmente pode condenar o sucesso do tratamento. Uma das fases da Endodontia, a obturação dos canais radiculares, devemos preencher todo o espaço anteriormente ocupado pela polpa dental, por materiais que sejam inertes aos tecidos ou que possuam boas propriedades biológicas. Tais materiais devem oferecer propriedades anti-sépticas e apresentar a capacidade de preencher e selar toda extensão dos canais radiculares. Assim sendo, caso o material obturador venha interferir após o tratamento endodôntico, que seja para estimular o reparo apical e periapical (Leal²⁴, 2005).

Encontramos no comércio materiais obturadores em estado sólido (cones de gutapercha e cones de resilon) e materiais em estado plástico (pastas e cimentos obturadores).

Um cimento obturador “ideal” deveria possuir propriedades como: estimular o reparo apical e periapical; ter ação antimicrobiana; não ser mutagênico ou carcinogênico; ser reabsorvido em caso de extravasamento acidental; ter bom selamento marginal; boa

viscosidade; ser radiopaco, fácil inserção; não ser solúvel; dentre outras propriedades (Leal²⁴, 2005).

Na Endodontia, encontramos cimentos obturadores com diferentes composições: cimento à base de óxido de zinco e eugenol (OZE); cimento à base de resina epóxica; cimento à base de hidróxido de cálcio, cimento à base de silicone, cimento à base de ionômero de vidro, cimentos resinosos, cimento experimental à base de polímero de mamona e cimento à base de MTA.

Em 1936, Grossman introduziu no mercado o cimento OZE, que nos dias atuais, ainda é utilizado com grande difusão e frequência pelos diversos países, e em diferentes marcas comerciais. Este cimento apresenta boas propriedades físico-químicas, no entanto não apresenta biocompatibilidade, sendo irritante aos tecidos apicais e periapicais. O potencial irritante do material obturador tem influência direta e significativa no reparo tecidual após o término do tratamento de canais radiculares, e o comportamento do cimento OZE não é adequado aos tecidos, levando à agressão atribuída à presença de eugenol livre. Os resultados das reações histológicas do cimento OZE foram bem evidenciados há décadas, foi comprovado que o eugenol é citotóxico (Langeland et al.²³, 1969; Rodrigues et al.³⁸, 1976; Lindqvist, Otteskog²⁷, 1980; Barbosa et al.⁷, 1993), resulta reações adversas em animais experimentais e humanos (Lindqvist, Otteskog²⁷, 1980), provoca dermatite de contato (Barkin et al.⁸, 1984) e reação alérgica verdadeira (Koch et al.²⁰, 1973; Barkin et al.⁸, 1984), e apresenta infiltrado inflamatório severo quando comparado com ao cimento à base de hidróxido de cálcio Sealapex (Tanomaru Filho et al.⁴¹, 1998).

Dentre os testes secundários recomendados para analisar o potencial de toxicidade e biocompatibilidade de amostras de materiais odontológicos, o uso da técnica de implantes de tubo de polietileno no tecido conjuntivo subcutâneo para avaliar as respostas

biológicas de materiais endodônticos é muito conhecida e preconizada, inclusive para o cimento de OZE (ADA⁴, 1972; Makkes et al.³², 1977; ANSI/ADA⁵, 1982; ISO 7405¹⁴: 1997). Esta metodologia já era preconizada por Torneck⁴², 1966; Torneck⁴³ 1967; Langeland et al.²³, 1969, porque os tubos apresentaram comportamento inerte diante do tecido conjuntivo, não interferindo na resposta tecidual.

Apesar dos avanços tecnológicos dos novos cimentos, o cimento de OZE é ainda bastante utilizado, devido seu baixo custo e fácil aquisição. O emprego do cimento de OZE teve uma crescente propagação em todo mundo como também no Brasil, portanto, a idéia de buscar um recurso que vise minimizar o efeito irritante deste cimento é bastante pertinente mesmo nos dias atuais.

Com o advento do laser, surgiram novas alternativas nos tratamentos médico, odontológico, fisioterápico, devido às suas diversas propriedades terapêuticas.

A palavra **LASER** é um acrônimo de origem inglesa que significa: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que traduzida na língua portuguesa significa: Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação.

O laser é uma radiação eletromagnética não ionizante, sendo uma fonte luminosa com características especiais, que se diferencia das outras fontes de luz, como por exemplo, a luz incandescente.

Einstein em 1917 postulou a Teoria da Emissão Estimulada de Radiação, onde afirmava que os fótons, ao incidir sobre os átomos, podem fazê-los produzir uma grande quantidade de luz. O primeiro aparelho em que usou emissão estimulada foi o **MASER** (*Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) por meio de um campo elétrico onde estimulava o gás amônia a produzir um feixe de microondas.

Em 1960, Maiman³¹, elaborou o primeiro aparelho laser, usando um cristal de rubi, que gerava luz de curta duração e alta densidade de energia, operando em 694,3

nanômetros (ηm). Entretanto, um dos primeiros trabalhos para avaliar o efeito do laser na cicatrização de feridas de tecido mole foi realizado por Mester et al.³³, 1971, que utilizaram o laser de rubi com comprimento de onda de 694,3 ηm .

A radiação laser é composta por fótons, todos de mesma cor e com o mesmo comprimento de onda, frequência e energia, portanto, é uma luz pura e esta característica é conhecida como monocromaticidade (Knappe et al.¹⁹, 2004).

A coerência é uma característica do laser, onde a emissão estimulada gera fótons cujas energias se somam e viajam na mesma direção, movendo-se em mesma fase no tempo e no espaço (Knappe et al.¹⁹, 2004).

A radiação laser é unidirecional e paralela ao eixo do tubo que a produz, o feixe de fótons é conseqüentemente colimado ou paralelo. Sua direcionalidade permite a obtenção de alta densidade de energia concentrada em pequenos pontos. Com o auxílio de dispositivos ópticos, sua radiação pode ainda ser polarizada. Estas características especiais desse tipo de luz que a faz ter propriedades terapêuticas e cirúrgicas importantes (Knappe et al.¹⁹, 2004).

A radiação laser requer algumas condições especiais, para sua produção, tais como o “meio ativo” que pode ser (sólido, líquido, gasoso ou misto), que gera luz quando excitadas por uma fonte de energia externa. Este processo é denominado de “bombeamento”. A função do bombeamento é transformar o meio ativo em meio amplificador de radiação, promovendo o fenômeno denominado “inversão de população”. Na inversão de população, os elétrons da camada de valência do meio absorvem energia bombeada e saltam para um nível de energia mais externo, logo, seu nível de energia será maior, porque este segundo nível está mais distante da influência do núcleo. Quando o primeiro elétron decai, ou seja, retorna ao seu nível de energia original, portanto menor, ocorre à liberação de uma energia altamente concentrada, denominada de *Fóton*. Isto gera

um processo em cascata e em progressão geométrica, resultando na emissão estimulada de radiação (Bagnato⁶, 2001).

O laser é classificado em dois grupos: laser de alta intensidade ou laser de alta potência ou laser cirúrgico ou HILT (*High Intensity Laser Treatment*); e laser de baixa intensidade (LBI) ou laser de baixa potência ou laser terapêutico ou LILT (*Low Intensity Laser Therapy*) ou LLLT (*Low Level Laser Therapy*).

As radiações ópticas produzidas pelos *lasers* têm basicamente as mesmas características, porém os efeitos são diferentes para cada tipo de laser utilizado. Quando trabalhamos com o laser em tecido vivo, buscamos resultados clínicos bastante específicos, a célula tem um determinado limiar de sobrevivência, isto depende do tecido onde está localizada e também do estado fisiológico da mesma (Karu¹⁸, 2003). Se utilizarmos o laser com a intenção de respeitar esse limiar de determinada célula, oferecemos uma baixa intensidade de energia, que será utilizada por ela de maneira a estimular sua membrana, e as membranas de suas mitocôndrias (Karu¹⁸, 2003). Dessa forma estaremos induzindo essa célula à biomodulação, ou seja, a célula trabalhará buscando um estado de normalização da região afetada. Neste caso o laser trabalhará em baixa densidade de potência. A biomodulação tecidual ocorre por meio de proliferação, adesão, respiração, produção de proteínas e outros produtos celulares (Almeida-Lopes et al.², 2001). Este tipo de terapia passou a ser chamado de *laser therapy* ou laserterapia, empregado o LBI para fins terapêuticos.

Como indicações do LBI podemos citar: potencialização do processo de reparo nos quadros de pós-operatório e cicatrização de tecido mole (Garcia et al.¹³, 1996), tecido ósseo e nervoso; quadros de edema instalado (onde se busca uma mediação do processo inflamatório) e quadros de dor crônica e/ou aguda (Almeida-Lopes¹, 2004).

Quando se trabalha com o laser operando em um nível de intensidade muito alta de energia a ponto dessa energia transformar-se em dano térmico e ultrapassar o limiar de sobrevivência dessa célula, levando a uma lise e conseqüentemente a morte celular, estaremos utilizando o laser com finalidade cirúrgica denominado laser cirúrgico ou HILT (Almeida-Lopes¹, 2004).

O comprimento de onda (λ) é à distância percorrida por uma onda em sua oscilação completa, medida em ηm e a freqüência de suas oscilações em Hertz (Hz). O comprimento de onda é de fundamental importância na interação laser-tecido. A radiação laser pode ser refletida, transmitida, absorvida ou espalhada “*scattering*” pelo tecido. A monocromaticidade do laser determina a absorção seletiva por parte dos cromóforos, com resposta afim a um ou a vários comprimentos de onda, fenômeno conhecido como ressonância a uma determinada freqüência. Cada comprimento de onda, portanto, terá um tipo diferente de interação segundo o tecido alvo (Knappe et al.¹⁹, 2004; Vladimirov et al.⁴⁴, 2004).

As ações terapêuticas do laser sobre os tecidos induzem os efeitos trófico-regenerativos, antiinflamatórios e analgésicos. Há trabalhos que demonstram um aumento na microcirculação local (Kujawa et al.²¹, 2004; Maier et al.³⁰, 1990; Miró et al.³⁴, 1984; Moore et al.³⁵, 2005), no sistema linfático (Lievens²⁶, 1991), proliferação de células epiteliais (Steinlechner, Dyson⁴⁰, 1993) e fibroblastos (Lubart et al.²⁹, 1995; Webb et al.⁴⁵, 1998), bem como aumento da síntese de colágeno dos fibroblastos (Enwemeka et al.¹¹, 1990; Skinner et al.³⁹, 1996). Em estudos clínicos (Bihari, Mester⁹, 1989; Reddy³⁷, 2004), confirmaram esses efeitos observados in vitro. Os estudos in vitro sobre fibroblastos descrevem um efeito proliferativo e/ou ativador da síntese protéica, dependendo das características e parâmetros do laser utilizado como: comprimento de onda, forma de

emissão, densidade de potência e densidade de energia utilizada. Desta forma, Segundo Al-Watban, Zhang³, 1994; Karu¹⁷, 1990, que demonstraram por trabalhos *in vitro* e *in vivo* com fibroblastos, principal célula responsável no reparo tecidual, a redução do tempo de cicatrização de feridas cutâneas e de mucosas.

Na Odontologia, o LBI vem sendo utilizado para finalidades terapêuticas efetivas, atuando como coadjuvante aos tratamentos, devido à sua ação analgésica, antiinflamatória, antiedematosa, bioestimuladora e indutora de reparo tecidual (Almeida-Lopes¹, 2004, Lizarelli²⁸, 2005).

O tecido conjuntivo apresenta diversos tipos de células separadas por um abundante material extracelular, que integra o sistema imunitário de defesa contra proteínas estranhas presentes nas bactérias, vírus, células tumorais, etc. Diversos mecanismos de defesa dependem das células e dos elementos intercelulares do tecido conjuntivo, pois este participa do processo inflamatório. A inflamação é uma reação defensiva, celular e vascular, contra elementos estranhos que possam penetrar no tecido conjuntivo ou algum tipo de substância química que possa agredir e irritar este tecido (Junqueira, Carneiro¹⁶, 2004; Kumar et al.²², 2005).

Os mastócitos são células residentes do tecido conjuntivo, que quando maduras apresentam-se globulosos, grandes e com citoplasma repleto de grânulos que se coram intensamente. O núcleo é pequeno, esférico, central e de difícil observação por estar freqüentemente encoberto pelos grânulos citoplasmáticos. Os grânulos secretores contêm mediadores químicos como histamina e glicosaminoglicanas. Os mastócitos colaboram com as reações imunes e tem papel fundamental na proteção do organismo, como por exemplo, na inflamação, nas respostas alérgicas e na expulsão de parasitas (Junqueira,

Carneiro¹⁶, 2004). Os mastócitos têm função relevante na gênese do tecido conjuntivo, incluindo a liberação de mediadores que estimulam a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (Garbuzenko et al.¹², 2002; Jordana¹⁵, 1993; Pereira et al.³⁶, 2007). Estudos demonstram a relação entre a presença de mastócitos e fibroses na pele (Garbuzenko et al.¹², 2002), língua (Pereira et al.³⁶, 2007) e glândulas salivares (Diao¹⁰, 1993).

O efeito do LBI no tecido conjuntivo em relação à reação irritante causada pelo cimento de OZE ainda é desconhecido e deve ser melhor esclarecido e pesquisado, por meio de estudos histológicos, uma vez que o LBI possui diferentes parâmetros de aplicação para cada caso, tornando a literatura contraditória e não conclusiva.

**“Pode um homem tornar-se culto pela
cultura dos outros, mas só se torna
sábio pelas suas próprias experiências.”**

Mansour Chalita

PROPOSIÇÃO

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito das aplicações imediata e após 24 horas do LBI vermelho ou infravermelho na reação do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos, causadas pelo cimento endodôntico OZE Endofill, nos períodos de 7 e 30 dias, mediante os objetivos específicos:

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Esta Tese foi dividida em dois Capítulos que correspondem a dois Artigos Científicos:

Capítulo 1 - Realizar uma análise histológica;

Artigo 1 - “Efeito do laser de baixa intensidade na resposta tecidual ao implante de cimento Endofill”

Capítulo 2 - Identificar e quantificar o padrão de fibrose e de mastócitos;

Artigo 2 - “Quantificação de fibrose e de mastócitos na resposta do tecido conjuntivo ao cimento Endofill irradiado por laser de baixa intensidade”

**“Quando pensar em desistir, lembre-se da luta que
foi começar e chegar até aqui...não desista nunca!”**

**Efeito do laser de baixa intensidade na resposta tecidual ao implante
de cimento Endofill***

CAPÍTULO 1

* Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Photomedicine and Laser Surgery*

Qualis Capes: A Internacional; Fator de Impacto: 1.280.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as reações do tecido conjuntivo ao implante de tubos de polietileno contendo o cimento endodôntico de óxido de zinco e eugenol (OZE) Endofill submetidos à irradiação do laser de baixa intensidade (LBI), imediatamente e 24 horas após o implante. Foram utilizados sessenta camundongos (*Mus musculus albinus*), distribuídos em três grupos experimentais (n=20): GI (controle), os animais receberam o implante do tubo contendo Endofill e não receberam a irradiação LBI; GII, implante do tubo com Endofill e irradiação LBI vermelho (InGaAlP) $\lambda 685\text{nm}$, $D=72\text{J}/\text{Cm}^2$, $E=2\text{J}$, $T=58\text{s}$, $P=35\text{mW}$; GIII, implante do tubo com Endofill e irradiação LBI infravermelho (AsGaAl) $\lambda 830\text{nm}$, $D=70\text{J}/\text{Cm}^2$, $E=2\text{J}$, $T=40\text{s}$, $P=50\text{mW}$. Os animais foram mortos depois de 7 e 30 dias, os blocos de tecidos foram confeccionados e seccionados em cortes seriados de $6\mu\text{m}$ de espessura e as lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Masson e analisadas ao microscópio óptico comum. Ao 7º dia, o GI apresentou picnose nuclear, ausência de vasos sanguíneos e macrófagos ativos; GII fibroblastos e macrófagos ativos, poucos capilares sanguíneos; GIII inflamação reduzida, angiogênese, fibroblastos ativos. Ao 30º dia, GI apresentou pouco tecido inflamado e poucos vasos sanguíneos; GII ausência de inflamação, fibroblastos com redução de volume, poucos macrófagos e vasos sanguíneos; GIII ausência de inflamação, numerosos fibroblastos, capilares sanguíneos com hemácias. Foi realizada uma análise estatística quali-quantitativa. A ação do LBI sobre o tecido conjuntivo diminuiu o efeito irritante oferecido pelo cimento Endofill, no período pós-operatório de 07 dias ($P>0,05$).

Palavras-chave: Endodontia, cimento óxido de zinco e eugenol, lasers, tecido conjuntivo.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the reactions of the connective tissue to the implant of polyethylene tubes containing the endodontic zinc oxide and eugenol sealer (ZOE) Endofill submitted to irradiation of the low level laser therapy (LLLT), immediately and 24h after the implant. Sixty mice were used (*Mus musculus albinus*), distributed into three experimental groups (n=20): GI (control), the animals received the implant of the tube with Endofill and no LLLT irradiation; GII, implant of the tube with Endofill and red LLLT irradiation (InGaAlP) $\lambda 685\text{nm}$, $D=72\text{J}/\text{Cm}^2$, $E=2\text{J}$, $T=58\text{s}$, $P=35\text{mW}$; GIII, implant of the tube with Endofill and infrared LLLT irradiation (AsGaAl) $\lambda 830\text{nm}$, $D=70\text{J}/\text{Cm}^2$, $E=2\text{J}$, $T=40\text{s}$, $P=50\text{mW}$. The animals were killed after 7 and 30 days, the blocks of tissue were cut into serial $6\mu\text{m}$ thick sections and glass slides were stained with Hematoxylin and Eosin and Masson Trichrome and then analyzed to the normal use optical microscope. At the 7th day, GI showed nuclear pyknosis, absence of blood vessels and active macrophages; GII showed fibroblasts and active macrophages, few bloodies capillaries; GIII showed reduced inflammation, angiogenesis and active fibroblasts. At the 30th day, GI showed few inflammation and few blood vessels; GII showed inflammation absence, fibroblasts with volume reduction, few macrophages and blood vessels; GIII showed inflammation absence, numerous fibroblasts, bloodies capillaries with erythrocytes. The statistical analysis carried out was quali-quantitative. The action of the LLLT on the connective tissue reduced the irritating effect produced by the Endofill sealer, at the post-operative period of 7 days ($P>0,05$).

Key-words: Endodontics, zinc oxide and eugenol sealer, lasers, connective tissue.

INTRODUÇÃO

As etapas da terapia endodôntica, como o diagnóstico, abertura coronária, preparo biomecânico, curativo de demora e obturação dos canais radiculares, quando bem executadas, são consideradas de fundamental importância para a obtenção do sucesso pós-tratamento^{1,2}.

No que diz respeito à obturação dos canais radiculares, o material obturador deve apresentar boas propriedades biológicas quanto físico-químicas, demonstradas nos diversos níveis de pesquisa, apresentando-se compatíveis para a aplicação clínica.

Com o avanço tecnológico da Endodontia, vários cimentos obturadores foram introduzidos no mercado. Dentre os cimentos endodônticos disponíveis, o cimento obturador à base de óxido de zinco eugenol (OZE), apresenta propriedades físico-químicas aceitáveis, entretanto, não apresenta comportamento biológico favorável ao tecido conjuntivo. Diversos estudos demonstram que o OZE é citotóxico, por conter eugenol em sua composição¹⁻⁴, não apresentando boa resposta tecidual aos testes de compatibilidade biológica dos materiais endodônticos³⁻⁷. Apesar de sua limitação no que tange aos aspectos biológicos, o cimento de OZE é mundialmente usado por diversas décadas até os dias atuais. Este fato torna oportuna a busca de um recurso que vise minimizar a resposta tecidual inflamatória atribuída pelo efeito irritante deste cimento.

Com o advento do laser de baixa intensidade (LBI), uma nova tecnologia passou a ser estudada com a finalidade de atenuar o efeito de determinada agressão como também de melhorar o reparo dos tecidos que foram agredidos.

O LBI foi descrito como um recurso coadjuvante na intenção de promover a bioestimulação e biomodulação da cicatrização de feridas⁸. O recurso visa acelerar a proliferação e diferenciação dos fibroblastos e osteoblastos⁹, reduzir o processo inflamatório e acelerar o reparo dos tecidos moles^{10,11}.

O efeito da bioestimulação do LBI também foi observado em células da polpa dental e na biomodulação da dentinogênese, promovendo uma redução no processo inflamatório¹².

As ações terapêuticas do LBI sobre os tecidos induzem os efeitos trófico-regenerativos, antiinflamatórios e analgésicos, demonstrando aumento: na microcirculação local^{13,14}, na drenagem do sistema linfático¹⁵ e na proliferação de células epiteliais¹⁶.

O objetivo deste estudo foi avaliar a modulação da resposta tecidual em camundongos ao implante de tubos de polietileno contendo o cimento de OZE Endofill, quando submetidos à irradiação imediata e após 24 horas do LBI vermelho ou LBI infravermelho.

MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA, da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Processo CEEA-FOAr N° 002/2005).

Sessenta camundongos, machos, *Mus musculus albinus*, pesando em média 40 gramas foram usados no experimento. Os animais foram divididos em três grupos de vinte camundongos cada, com períodos experimentais de 7 e 30 dias, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos grupos de acordo com o material testado, períodos experimentais e número de animais

Grupos	Material Testado	7 Dias	30 Dias	Total
I	Endofill sem LBI (controle)	10 animais	10 animais	20 animais
II	Endofill + LBI vermelho	10 animais	10 animais	20 animais
III	Endofill + LBI infravermelho	10 animais	10 animais	20 animais

O cimento Endofill foi preparado de acordo com as recomendações do fabricante e posteriormente inserido em tubos de polietileno (Kit de selantes Delton - Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil). Estes tubos mediam 1,5mm de diâmetro interno; 2mm de diâmetro externo, 10 mm de comprimento. Os tubos tiveram uma das extremidades seladas a quente e foram previamente esterilizados em autoclave. Foi utilizado um instrumento Lentulo (Dentsply/Maillefer - Maillefer Instruments AS, Ballaigues, Switzerland) acionado por um motor elétrico (Nouvag TCM Endo, USA) numa rotação de 1000 rpm, para inserir o cimento espatulado dentro dos tubos evitando-se a formação de bolhas. Qualquer excesso de cimento foi removido com auxílio de uma gaze estéril. Imediatamente, estes tubos foram implantados em tecido subcutâneo dos camundongos.

Os camundongos foram anestesiados, por injeção intramuscular de cloridrato de cetamina - Ketamina 10% (Agener União Química Farmacêutica Nacional, Embu-Guaçu, SP, Brasil), anestésico geral na dosagem de 0,1 ml/100g de peso corpóreo, associado ao relaxante muscular e analgésico cloridrato de tiazina - Rompun (Bayer S.A. - Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) na dosagem de 0,04ml/100g de peso corpóreo.

Foi realizada a tricotomia na região dorsal média, seguida da anti-sepsia do campo operatório com detergente de mamona Endoquil (Poliquil, Ltda., Araraquara, SP, Brasil). Na linha média, equidistante da inserção caudal e da cabeça do animal, foi realizada uma incisão

transversal de aproximadamente 4mm de comprimento em relação ao corpo do animal com tesoura cirúrgica de ponta fina. Com tesoura de ponta romba, foi realizado a divulsão lateral do tecido subcutâneo, confeccionado uma loja cirúrgica para acomodação do implante.

Os tubos foram preenchidos com o material a ser testado, evitando a formação de bolhas com auxílio do instrumento Lentulo (Dentsply/Maillefer - Maillefer Instruments AS, Ballaigues, Switzerland) acionado por um motor elétrico (Nouvag TCM Endo, USA) numa rotação de 1000 RPM. Posteriormente foram implantados na loja cirúrgica, as bordas da ferida foram aproximadas e suturadas com Vicryl 4-0 estéril (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil).

Os grupos experimentais GII e GIII receberam a irradiação LBI, imediatamente e 24 horas após o ato cirúrgico. O LBI utilizado foi o Thera Lase (DMC, Equipamentos Ltda. E.P.P., São Carlos, SP, Brasil), com os respectivos parâmetros: GII, LBI vermelho (InGaAlP) $\lambda 685\text{nm}$, $D=72\text{J}/\text{Cm}^2$, $E=2\text{J}$, $T=58\text{s}$, $P=35\text{mW}$; GIII, LBI infravermelho (AsGaAl) $\lambda 830\text{nm}$, $D=70\text{J}/\text{Cm}^2$, $E=2\text{J}$, $T=40\text{s}$, $P=50\text{mW}$.

O estado geral dos animais foi avaliado diariamente, sendo estes mantidos em gaiolas plásticas individuais, antes e após o procedimento cirúrgico e até a morte dos mesmos, sob condições controladas de limpeza, temperatura, umidade, luz e alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*. Os animais não receberam medicação pós-operatória com a intenção de não provocar resultados alterados.

Depois de 7 e 30 dias, os fragmentos teciduais contendo tecido cutâneo, subcutâneo e tubo de polietileno foram removidos com suficiente margem de segurança sob anestesia geral. Em seguida os animais foram mortos por overdose anestésica de hidrato de cloral a 10%, a 0,4%

ml por 100g de peso, injetado via intra-peritoneal. Os animais foram colocados temporariamente no freezer e posteriormente incinerados.

Os fragmentos foram fixados em formalina a 10%, por 72 horas, desidratados, incluídos em parafina e seccionados em cortes histológicos de 6 μ m em plano longitudinal, passando pela abertura do tudo de polietileno e incluindo toda interface entre o material e o tecido conjuntivo.

As lâminas foram confeccionadas e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), para analisar a morfologia celular e Tricrômico de Masson (TM), para analisar a qualidade da substância intercelular. A avaliação microscópica foi feita com emprego de microscópio óptico comum (Zeiss, modelo Jenaval, Germany). A resposta do tecido conjuntivo em contato com o cimento testado foi avaliada por análise subjetiva e comparativa, por dois observadores, que não tinham conhecimento da ordem dos grupos analisados, em duas ocasiões diferentes. O grau de reação do tecido conjuntivo provocados pelos materiais de teste segundo o grau de inflamação foi avaliado pela presença de células inflamatórias, alteração na população das células residentes do tecido conjuntivo, alterações da substância intercelular amorfa e da substância intercelular fibrosa. O material foi classificado em escores obtidos segundo a ISO 7405: 1997¹⁷: 0 - Ausência de inflamação, 1 - Inflamação leve, 2 - Inflamação moderada, 3 - Inflamação severa, 4 - Presença de tecido necrótico. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelos métodos estatísticos não-paramétricos, Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Comparação Múltipla de Dunn, com nível de significância de 5%, utilizando o software GraphPad InStart 3 (DATASET 1. ISD, San Diego - USA).

RESULTADOS

Análise Histológica

GI (Controle) - 07 Dias - HE

Na análise feita aos 7 dias, na abertura do tubo formou-se uma saliência constituída por células e substância intercelular com restos necróticos. Houve ausência de vasos sangüíneos em meio ao tecido pobremente celularizado, sendo que as células apresentavam, núcleos picnóticos, aliado a presença de macrófagos ativos. (Fig. 1a).

GI (Controle) - 07 Dias - TM

Por esta coloração, observa-se o tecido conjuntivo com a população de células morfológicamente alterados na forma e no volume nuclear. A substância intercelular está desorganizada e pouco estruturada com relação às fibrilas colágenas. A porção central do tubo encontra-se preenchida por células do sistema imune, principalmente macrófagos (Fig. 1b).

GI (Controle) - 30 Dias - HE

Aos 30 dias de análise, a organização do colágeno ao longo da abertura do tubo apresenta adiantado estado de arranjo tecidual, há pouco tecido inflamado e as células apresentam forma normal. Os fibroblastos encontram-se ao redor das fibras colágenas, são achatados com núcleos alongados, ocorre também à presença de macrófagos ocasionais. Além disso, os vasos sangüíneos são poucos numerosos e ocorre a presença de alguns capilares linfáticos (Fig. 1c).

GI (Controle) - 30 Dias - TM

Por meio desta coloração, percebem-se as fibras colágenas orientadas em meio às células do tecido conjuntivo e presença de alguns capilares linfáticos (Fig. 1d).

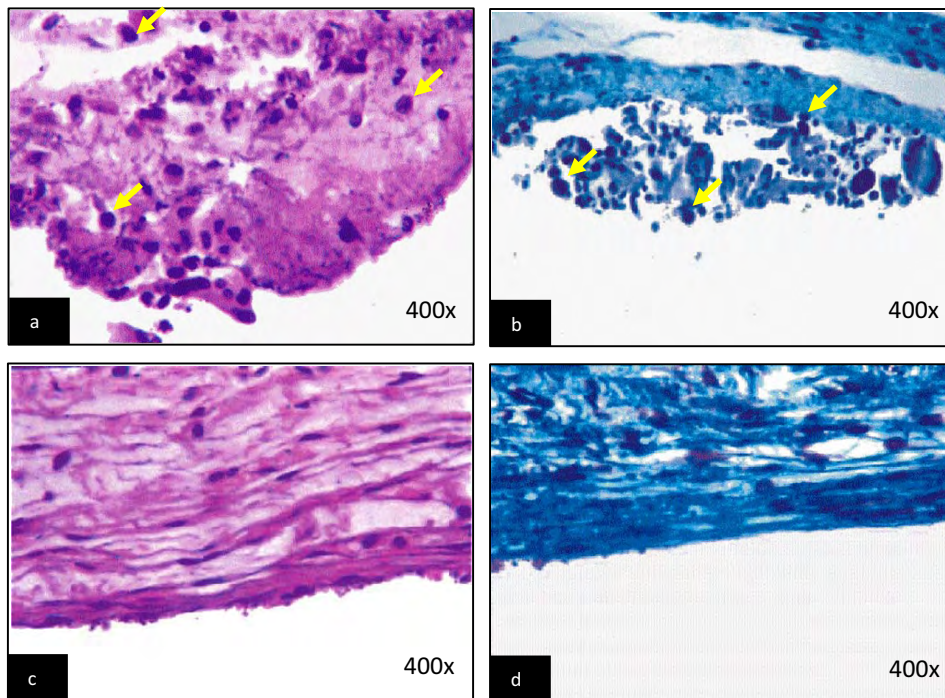


Figura 1 - Resultados histológicos do GI, aos 7 dias. Nas colorações HE (a) e TM (b), é nítido o grande número de macrófagos ativos (→). Já aos 30 dias, a maturação organizacional das fibras colágenas e a diminuição no número de células inflamatórias podem ser observadas HE (c) e TM (d).

GII (LBI vermelho) - 07 Dias - HE

Aos 7 dias de análise, a abertura do tubo encontra-se com ligeiro acúmulo de líquido tissular entre as células e fibrilas colágenas. Há um grande número de células residentes do tecido conjuntivo, os fibroblastos e os macrófagos exuberantes, volumosos e ativos. Os capilares sanguíneos são pouco numerosos (Fig. 2a).

GII (LBI vermelho) - 07 Dias - TM

Esta coloração nos permite analisar que, aos 7 dias, os fibroblastos ativos produzem fibrilas colágenas que rodeiam a população de células conjuntivas. Na abertura do tubo, há uma concentração de macrófagos ativos (Fig. 2b).

GII (LBI vermelho) - 30 Dias - HE

Neste período de análise, o LBI vermelho provocou uma diminuição no número de células, os fibroblastos apresentaram uma redução de volume e as fibras colágenas da substância intercelular encontram-se em processo de amadurecimento. Há presença de poucos vasos sanguíneos e os macrófagos em número reduzido encontram-se na abertura do tubo (Fig. 2c).

GII (LBI vermelho) - 30 Dias - TM

Pelo TM, observa-se o amadurecimento de fibras colágenas e o reduzido número de células do tecido conjuntivo (Fig. 2d).

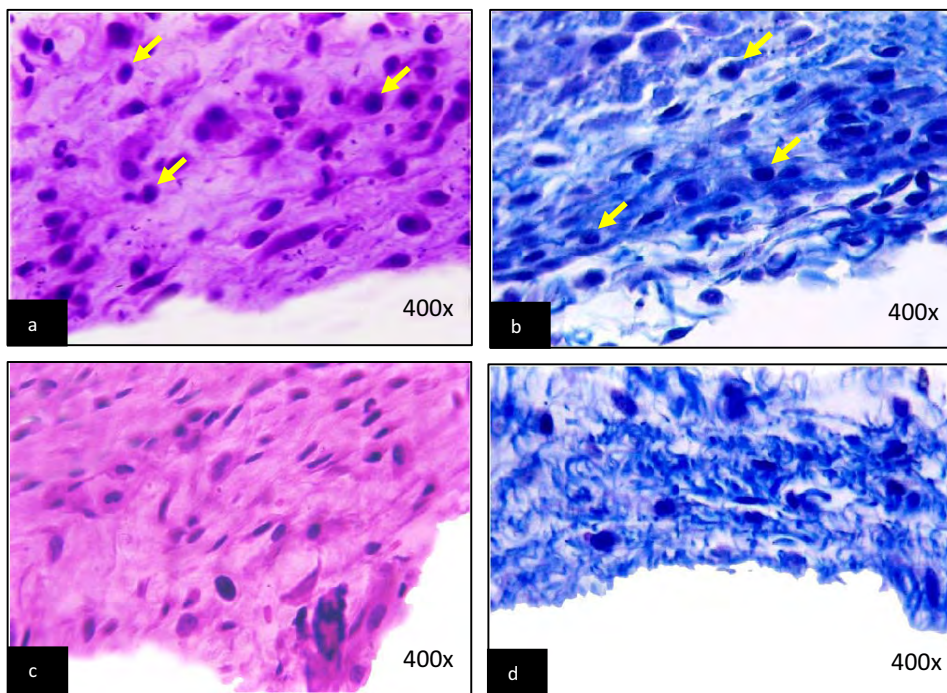


Figura 2 - Resultados histológicos do GII, aos 7 dias. Nas colorações HE (a) e TM (b), pode se ver um tecido conjuntivo com uma concentração elevada de macrófagos ativos (→). Aos 30 dias, a redução no número de células e o aumento na concentração de fibrilas colágenas são exuberantes HE (c) e TM (d).

GIII (LBI infravermelho) - 07 Dias - HE

Na análise feita aos 7 dias, nos foi permitido averiguar que na abertura do tubo, há resíduos do cimento Endofill, corados em negro e em contato com o tecido conjuntivo do dorso do animal. O tecido conjuntivo apresentou inflamação reduzida com hipertrofia vascular com estase sangüínea e pouca marginação leucocitária. As células adjacentes aos vasos se apresentaram como leucócitos pouco numerosos e escassos polimorfonucleares. Há presença de fibroblastos em atividade rodeados por fibrilas colágenas e presença de macrófagos ocasionais. O tecido conjuntivo apresentou-se muito celularizado. Junto à abertura do tubo em meio a células do conjuntivo ocorre uma intensa angiogênese (Fig. 3a).

GIII (LBI infravermelho) - 07 Dias - TM

Por meio desta coloração, comprova-se a presença de fibrilas colágenas rodeando os fibroblastos ativos. Há também um ligeiro acúmulo de líquido tecidual que promove um ligeiro afastamento da malha fibrilar. Na abertura do tubo percebe-se macrófagos ocasionais (Fig. 3b).

GIII (LBI infravermelho) - 30 Dias - HE

No período de 30 dias de análise, na abertura do tubo, persistem resíduos do cimento corados em negro. O tecido conjuntivo encontra-se amadurecido, com grande número de fibroblastos maduros exuberantes, com núcleos volumosos, citoplasma claro com a forma das células alongadas. Foram observadas fibrilas colágenas em processo de amadurecimento, ausência de inflamação e capilares sangüíneos localizados a distância do tubo exibindo hemácias preenchendo a luz e ausência de marginação leucocitária (Fig. 3c).

GIII (LBI infravermelho) - 30 Dias -TM

Pela análise das lâminas coradas pelo TM confirma-se o processo de amadurecimento das fibras colágenas e grande atividade metabólica das células conjuntivas.

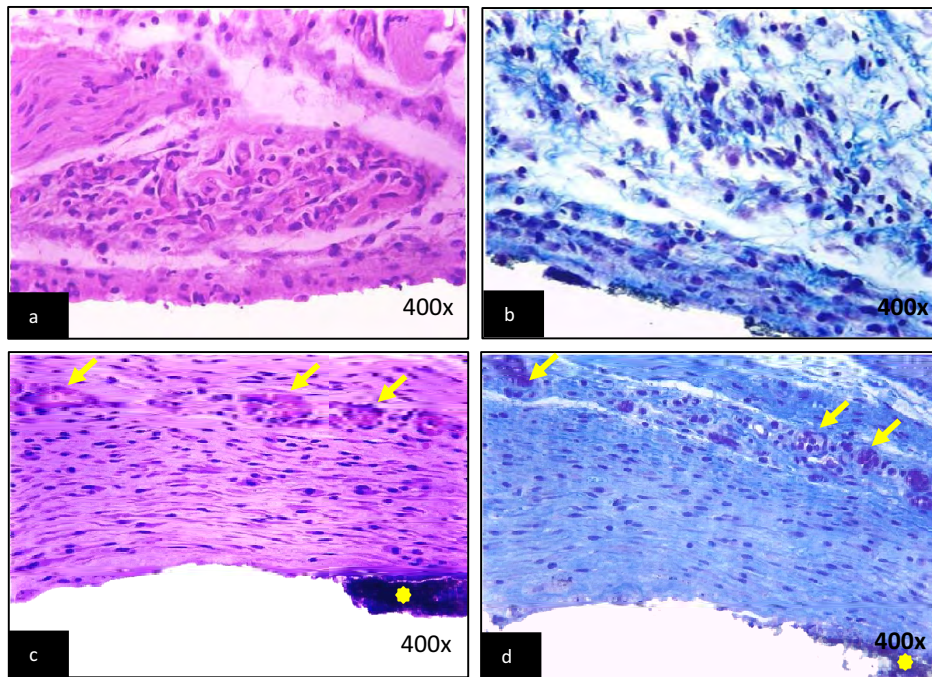


Figura 3 - Resultados histológicos do GIII, aos 7 dias. Nas colorações HE (a) e TM (b), pode se notar a presença de macrófagos ocasionais em meio a um tecido conjuntivo moderadamente organizado. Aos 30 dias, a organização do tecido conjuntivo é elevada, com fragmentos do material ainda visíveis (*), a neovascularização também é evidente (→) em HE (c) e TM (d).

Análise Estatística

Os dados de escores referentes à intensidade da inflamação causada pelos materiais implantados e irradiados com LBI foram analisados estatisticamente mediante uma abordagem não paramétrica que, em geral testa a hipótese de igualdade de valores medianos entre grupo de estudo. Com a finalidade de se avaliar o efeito dos materiais implantados sobre os valores de inflamação em cada período observado, efetuaram-se, para os tempos de 7 e 30 dias, o Teste de

Kruskal-Wallis (Tabela 2) e o Teste de Comparação Múltipla de Dunn (Tabela 3). O nível de significância adotado foi o valor convencional de 5%.

Tabela 2 - Teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%, para os grupos experimentais nos períodos de 7 e 30 dias

Grupo	Nº de Amostras	Soma dos Graus	Média dos Graus
GI - C 07 Dias	10	483.50	48.350
GII - LV 07 Dias	10	329.00	32.900
GIII - LIV 07 Dias	10	314.00	31.400
GI - C 30 Dias	10	261.00	26.100
GII - LV 30 Dias	10	234.50	23.450
GIII - LIV 30 Dias	10	208.00	20.800

Observa-se na Tabela 3, que houve diferença estatisticamente significativa entre o GI - C 07 dias com três grupos de período experimental de 30 dias (GI 30 dias, GII 30 dias, GIII 30 dias), respectivamente. Nos demais grupos não houve diferença estatística significativa entre os grupos e períodos.

Tabela 3 - Teste de Comparação Múltipla de Dunn

Comparação	Grau de Diferença Significativa	Valor de P
GI - C 07 Dias vs. GII - LV 07 Dias	15.450	ns P>0.05
GI - C 07 Dias vs. GIII - LIV 07 Dias	16.950	ns P>0.05
GI - C 07 Dias vs. GI - C 30 Dias	22.250	* P<0.05
GI - C 07 Dias vs. GII - LV 30 Dias	24.900	* P<0.01
GI - C 07 Dias vs. GIII - LIV 30 Dias	27.550	* P<0.01
GII - LV 07 Dias vs. GIII - LIV 07 Dias	1.500	ns P>0.05
GII - LV 07 Dias vs. GI - C 30 Dias	6.800	ns P>0.05
GII - LV 07 Dias vs. GII - LV 30 Dias	9.450	ns P>0.05
GII - LV 07 Dias vs. GIII - LIV 30 Dias	12.100	ns P>0.05
GIII - LIV 07 Dias vs. GI - C 30 Dias	5.300	ns P>0.05
GIII - LIV 07 Dias vs. GII - LV 30 Dias	7.950	ns P>0.05
GIII - LIV 07 Dias vs. GIII - LIV 30 Dias	10.600	ns P>0.05
GI - C 30 Dias vs. GII - LV 30 Dias	2.650	ns P>0.05
GI - C 30 Dias vs. GIII - LIV 30 Dias	5.300	ns P>0.05
GII - LV 30 Dias vs. GIII - LIV 30 Dias	2.650	ns P>0.05

* - Com diferença estatisticamente significativa entre os grupos

ns - Sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos

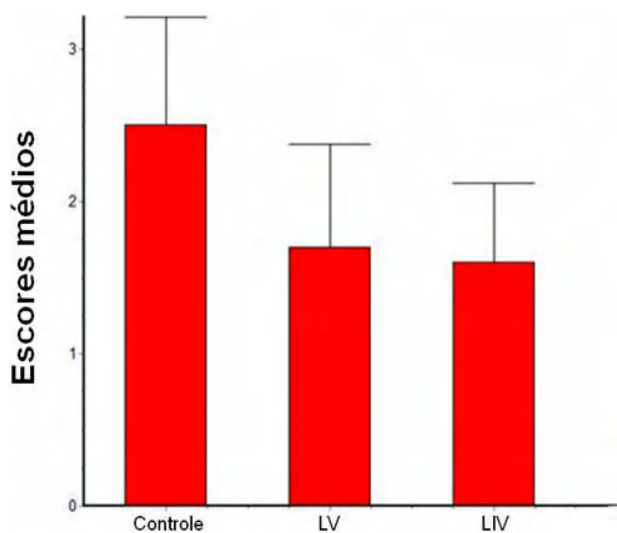


Fig. 4 - 7 Dias

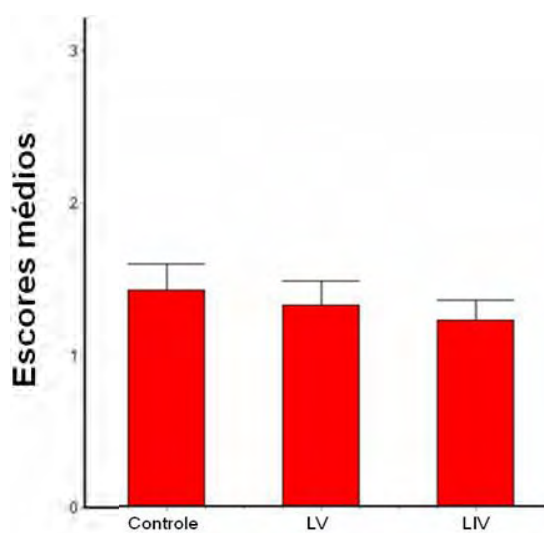


Fig. 5 - 30 Dias

Figuras 4 e 5 - Representação gráfica dos escores médios dos fenômenos histológicos de cada grupo experimental nos períodos de avaliação de 7 e 30 dias.

DISCUSSÃO

A técnica de emprego de implantes de tubo de polietileno em tecido subcutâneo de animais com a intenção de avaliar *in vivo* a biocompatibilidade e respostas biológicas permite que o material a ser testado fique em contato direto com o tecido conjuntivo. Os resultados obtidos nesta técnica servem como substrato para interpretar a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos, como o cimento de OZE¹⁷⁻²¹.

O cimento endodôntico deve possuir propriedades biológicas e físico-químicas, contudo as biológicas devem prevalecer e serem consideradas como mais importantes^{6,22}. Pelos testes de biocompatibilidade podemos pesquisar se o material é bem tolerado pelos tecidos. O cimento de OZE tem satisfatório desempenho em relação a suas propriedades físico-químicas. Contudo, não apresenta comportamento biológico adequado, por conter eugenol em sua composição²². A

presença do eugenol livre atua levando a injúrias teciduais, bem como depressor celular^{23,24}. O eugenol pode permanecer por longos períodos de tempo de até 10 anos, atuando como irritante ao tecido, este fato poderia explicar a persistência do processo inflamatório²⁴.

Neste estudo, os cimentos foram implantados imediatamente depois de preparados, seguindo as recomendações do fabricante. O implante colocado logo depois da manipulação do cimento pode melhor refletir as condições clínicas normais, devido ao contato direto do material com o tecido conjuntivo.

Conhecendo a reação que o cimento Endofill promove, utilizamos neste estudo o LBI, para direcionar a uma resposta tecidual mais favorável, já que a intenção é de respeitar o limiar celular.

O LBI promove a bioestimulação e biomodulação, ou seja, fornece à célula uma baixa intensidade de energia, para estimular a membrana celular e suas organelas, reparando o tecido lesado⁸⁻¹¹. Como as ações terapêuticas dos LBI levam ao aumento da microcirculação local, angiogênese, proliferação de células epiteliais e fibroblastos, aumento da síntese de colágeno, ação antiinflamatória^{25,26}, o seu emprego em nosso estudo pode ser justificado com a finalidade de minimizar o efeito irritante do cimento Endofill.

Contudo, a literatura não demonstra estudos que avaliaram a reação tecidual do implante de cimento de OZE com posterior irradiação de LBI.

O camundongo foi utilizado neste estudo como modelo animal, porque apresenta melhor metabolismo em relação ao rato, ou seja, melhores respostas biológicas, pois é um animal geneticamente definido que permite resultados mais uniformes. O camundongo é intensamente utilizado e conhecido cientificamente, sendo o modelo mais utilizado em pesquisas no mundo²⁷.

O sistema de rodízio de implantes de tubos em animais poderia reduzir o número dos mesmos em nosso estudo, contudo, devido ao fato do efeito biológico fotoelétrico do LBI, que é bastante conhecido na literatura^{11,26,28}, não o utilizamos. Este efeito poderia interferir e atuar sobre células, moléculas e átomos, tornando-se inviável o uso do sistema de rodízio de tubos no mesmo animal.

O LBI apresenta efeitos primários ou diretos, como bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos, e efeitos secundários ou indiretos, como, estímulo a microcirculação e ao trofismo celular. Na atuação sistêmica do LBI, a resposta fotobiológica age diretamente na célula e produz efeito imediato ou primário, levando ao aumento do metabolismo celular, atuando sobre as cristas mitocondriais, favorecendo a produção de energia celular²⁸.

Empregamos duas aplicações LBI, uma imediata ao implante dos tubos e outra 24 horas após. Esta conduta está de acordo com resultados obtidos em estudos^{29,30}, que mostraram que a melhor resposta celular, proliferação de celular e aumento de metabolismo foram mais frequentes quando se utilizou duas aplicações em intervalos de tempo de 24 horas. Os parâmetros do LBI utilizados neste trabalho foram determinados devido aos resultados positivos encontrados em estudo realizado em tecido conjuntivo³¹.

Embora os testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos em tecido conjuntivo subcutâneo não possam ser extrapolados diretamente ao ser humano, eles são recomendados como preliminares e indicativos^{17, 20,21} para comparar o grau de irritabilidade do material testado. Apesar do tecido conjuntivo subcutâneo não reproduzir as condições pulpare e periapicais, esta metodologia é relativamente simples para identificar as possíveis reações teciduais que serão causadas.

De acordo com os respectivos parâmetros do LBI utilizados, nossos resultados obtidos demonstraram uma melhor resposta tecidual aos 7 dias nos grupos irradiados com LBI, quando comparados com o grupo controle.

Baseando-se nos resultados encontrados, apesar de não haver diferença estatística significativa entre os grupos, o uso coadjuvante do LBI mostrou-se válido quando do emprego de um cimento pouco biológico, como o cimento de OZE. Tanto o emprego do LBI vermelho quanto o LBI infravermelho mostrou determinada capacidade de biomodulação, ao período de 7 dias. Já no período de 30 dias ocorreu o processo de reparo tecidual em todos os grupos, ilustrando a menor diferença em favor dos grupos irradiados.

Esse trabalho ilustra a necessidade de outros estudos futuros com a intenção de fundamentar os melhores parâmetros para irradiação do LBI visando a biomodulação na resposta tecidual ao efeito irritante causado, não só pelo cimento de OZE, como também por outros materiais, de modo que estes possam ser extrapolados para seu emprego clínico, já que este mecanismo de ação é desconhecido na literatura.

CONCLUSÃO

Considerando-se os padrões de condições de execução deste trabalho e de acordo com a metodologia empregada, nos permitem concluir que:

A ação do LBI, sobre o tecido conjuntivo, diminuiu o efeito irritante oferecido pelo cimento Endofill, no período de 7 dias. Aos 30 dias ocorreu reparo tecidual, independente da utilização do LBI.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista (FOAr-UNESP).

REFERÊNCIAS

- 1) Spangberg, L., Langeland, K. (1973). Biologic effect of dental materials: 1. Toxicity of root canal filling materials on HeLa cells in vitro. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 35:402-414.
- 2) Langeland, K. (1974). Root canal sealants and pastes. *Dent. Clin. North Am.* 18:309-327.
- 3) Lindquist, L., Otteskog, P. (1980). Eugenol: liberation from dental materials and effect on human diploid fibroblast cells. *Scand. J. Dent. Res.* 88:552-556.
- 4) Hume, W.R. (1984). Effect of eugenol on respiration and division in human pulp, mouse fibroblasts, and liver cells in vitro. *J. Dent. Res.* 63:1262-1265.
- 5) Hensten-Pettersen, A., Helgeland, K. (1977). Evaluation of biologic effects of dental materials using four different cell culture techniques. *Scand. J. Dent. Res.* 85:291-296.
- 6) Leonardo, M.R., Silva, L.A., Almeida, W.A., Utrilla, L.S. (1999). Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod. Dent. Traumatol.* 15:28-32.
- 7) Barkin, M.E., Boyd, J.P., Cohen, S. (1984). Acute allergic reaction to eugenol. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 57:441-442.

- 8) Kana, J.S., Hutschenreiter, G., Haina, D., Waidelich, W. (1981). Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch. Surg.* 116:293-296.
- 9) Van Breugel, H.H.F.I., Bar, P.R.D. (1992). Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg. Med.* 12:528-537.
- 10) Basford, J.R. (1995). Low-intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg. Med.* 16:331-342.
- 11) Enwemeka, C.S., Reddy, K. (2000). The biological effects of laser therapy and other physical modalities on connective tissue repair processes. *Laser Ther.* 12:22-30.
- 12) Ferreira, A.N.S., Silveira Jr, L., Genovese, W.J., et al. (2006). Effect of GaAlAs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. *Photomed. Laser Surg.* 24:358-365.
- 13) Kujawa, J., Zavodnik, L., Zavodnik, I., Buko, V., Lapshyna, A., Bryszewska, M. (2004). Effect of low-intensity (3.75-25 J/cm²) near-infrared (810 nm) laser radiation on red blood cell ATPase activities and membrane structure. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 22:111-117.
- 14) Moore, P., Ridgway, T.D., Higbee, R.G., Howard, E.W., Lucroy, M.D. (2005). Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg. Med.* 36:8-12.
- 15) Lievens, P.C. (1991). The effect of laser irradiation on the vasomotricity of the lymphatic system. *Laser Med. Sci.* 6:189-191.

- 16) Steinlechner, C.W.B., Dyson, M. (1993). The effects of low level laser therapy on the proliferation of keratinocytes. *Laser Ther.* 5:65-73.
- 17) International Organization For Standardization. Dentistry. (1997). Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. Test methods for dental materials: ISO/TR 7405.
- 18) Torneck, C. (1966). Reaction of rat connective tissue polyethylene tube implants. Part I. *Oral Surg.* 21:379-387.
- 19) Torneck, C. (1967). Reaction of rat connective tissue polyethylene tube implants. Part II. *Oral Surg.* 24:674-683.
- 20) American Dental Association. Council on Dental Materials and Devices of the American Dental Association. (1972) Biologic effect of dental materials. *J Am Dent Assoc* 84:375-395.
- 21) American National Standards Institute/American Dental Association. (1982). Specification n°41° for recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. New York: ANSI/ADA.
- 22) Barbosa, S.V., Araki, K., Spangberg, L.S. (1993). Cytotoxicity of some modified root canal sealers and their leachable components. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 75:357-361.
- 23) Leonardo, M.R., Utrilla, L.S., Rothier, A., Leonardo, R.T., Consolaro, A. (1990). Comparison of subcutaneous connective tissue responses among three different formulations of gutta-percha used in thermatic techniques. *Int. Endod. J.* 23:211-217.

- 24) Yesilsoy, C., Koren, L.Z., Morse, D.R., Kobayashi, C. (1988). A comparative tissue toxicity evaluation of established and newer root canal sealers. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 65:459-467.
- 25) Miró, L., Coupe, M., Charras, C., Jambon, C., Chevalier, J.M. (1984). Estudio capiloscopico de la acción de un láser de AsGa sobre la microcirculación. *Inv. Clin. Laser* 1:9-14.
- 26) Maier, M., Haina, D., Landthaler, M. (1990). Effect of low energy laser on the growth and regeneration of capillaries. *Lasers Med. Sci.* 5:381-386.
- 27) Canadian Council on Animal Care. Annual Report, Guidelines on: laboratory animal procedures 2006-2007. Ottawa: CCAC; 2006-2007.
- 28) Karu, T.I. (2003). Low-power laser therapy, In: *Biomedical Photonics Handbook*. Florida: CRC Press. pp. 1-48.
- 29) Brondon, P., Stadler, I., Lanzafame, R.J. (2005). A study of the effects of phototherapy dose interval on photobiomodulation of cell cultures. *Lasers Surg. Med.* 36:409-413.
- 30) Ng, G.Y., Fung, D.T., Leung, M.C., Gu, X. (2004). Ultrastructural comparison of medial collateral ligament repair after single or multiple applications of GaAlAs laser in rats. *Lasers Surg. Med.* 35:317-323.
- 31) Pretel, H., Lizarelli, R.F., Ramalho, L.T. (2007). Effect of low-level laser therapy on bone repair: Histological study in rats. *Lasers Surg. Med.* 39:788-796.

**“Se você quer o melhor das pessoas,
dê o máximo de si, já que a vida lhe deu tanto”**

**Quantificação de fibrose e mastócitos na resposta do tecido
conjuntivo ao cimento Endofill irradiado por laser de baixa
intensidade***

CAPÍTULO 2

* Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Lasers in Medical Science*

Qualis Capes: A Internacional; Fator de Impacto: 1.186.

RESUMO

O laser de baixa intensidade (LBI) acelera o processo de reparo dos tecidos após injúrias, aumentando a proliferação dos fibroblastos e a síntese de colágeno. Os mastócitos induzem proliferação de fibroblastos e desenvolvimento de fibrose local. O objetivo deste estudo foi quantificar o padrão de neoformação do tecido conjuntivo fibroso (fibrose) e a densidade de mastócitos na reação do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos frente ao implante de tubos de polietileno preenchidos com cimento endodôntico óxido de zinco e eugenol (OZE) Endofill, quando submetidos à irradiação LBI, imediatamente e 24 horas pós-implante. Foram utilizados sessenta camundongos (*Mus musculus albinus*), divididos em 3 grupos (n=20): GI (controle), os animais receberam o implante do tubo contendo Endofill e não receberam a irradiação LBI; GII, implante do tubo com Endofill e LBI vermelho (InGaAlP) $\lambda 685\text{nm}$, $D=72\text{J}/\text{Cm}^2$, $E=2\text{J}$, $T=58\text{s}$, $P=35\text{mW}$; GIII, implante do tubo com Endofill e irradiação LBI infravermelho (AsGaAl) $\lambda 830\text{nm}$, $D=70\text{J}/\text{Cm}^2$, $E=2\text{J}$, $T=40\text{s}$, $P=50\text{mW}$. Os animais foram mortos nos períodos de 7 e 30 dias, as lâminas foram confeccionadas e coradas com Picrosírius para fibrose e Azul de Toluidina para mastócitos. Os resultados foram analisados ao microscópio óptico comum e de luz polarizada para a fibrose. A análise estatística realizada foi quali-quantitativa. Aos 30 dias, o tecido conjuntivo reagiu ao cimento Endofill de forma menos favorável, quando submetido à irradiação LBI vermelho. A irradiação LBI não ofereceu melhoria no padrão de fibrose, porém proporcionou queda significativa na concentração de mastócitos independente do período estudado.

Palavras-chave: Endodontia, cimento óxido de zinco e eugenol, lasers, fibrose, mastócitos, morfometria.

ABSTRACT

The low level laser therapy (LLLT) is able to accelerate the healing process of tissue after an injury, by increasing fibroblast cell proliferation and collagen synthesis. The mast cells (MC) induce fibroblast proliferation and development of local fibrosis. The aim of this study was to quantify the rate of the fibrous connective tissue neoformation (fibrosis) and density of the MC in the reaction of the subcutaneous connective tissue of the mice after the implant of polyethylene tubes filled with the zinc oxide and eugenol sealer (ZOE) Endofill, when submitted to the LLLT irradiation, immediately and 24h after implant. Sixty mice were used (*Mus musculus albinus*), divided into 3 groups (n=20): GI (control), the animal received the polyethylene tube implant with the Endofill and no LLLT irradiation; GII, tube implant with Endofill and red LLLT irradiation (InGaAIP), $\lambda 685\text{nm}$, $D=72\text{J}/\text{Cm}^2$, $E=2\text{J}$, $T=58\text{s}$, $P=35\text{mW}$; GIII, tube implant with Endofill and infrared LLLT irradiation (AsGaAl), $\lambda 830\text{nm}$, $D=70\text{J}/\text{Cm}^2$, $E=2\text{J}$, $T=40\text{s}$, $P=50\text{mW}$. The animals were killed in the periods of 7 and 30 days, the glass slides were stained with Picrosirius for fibrosis and Toluidine Blue for MC. The results were analyzed through the normal use optical microscope and a polarized light one for fibrosis. The statistical analysis carried out was quali-quantitative. In the post-operative period of 30 days the connective tissue reacted in a less favorable way to the sealer Endofill, when submitted to the irradiation of red LLLT. The LLLT irradiation didn't improve the fibrosis rate, however it provided significant fall in the concentration of MC independent of the studied period.

Key-words: Endodontics, zinc oxide eugenol sealer, lasers, fibrosis, mast cells, morphometry.

INTRODUÇÃO

Com o avanço técnico-científico da Odontologia, o laser de baixa intensidade (LBI) passou a ser utilizado buscando diversos benefícios, principalmente na perspectiva de reparar os tecidos lesados. Estudos demonstram que o LBI é eficiente na redução do processo inflamatório, acelera o reparo dos tecidos moles, aumenta a síntese de ATP, bem como estimula síntese de DNA e proliferação celular [1, 2]. O LBI promove angiogênese, aumenta depósito de fibras colágenas e aumenta a proliferação de fibroblastos [2-7] provocando fibrose intersticial, especialmente ao redor dos vasos capilares [8] e conseqüentemente redução no número de mastócitos [9].

O cimento à base de óxido de zinco eugenol (OZE), é utilizado como material obturador dos canais radiculares na Endodontia. Por diversas décadas, o OZE é amplamente empregado em muitos países sob variadas marcas comerciais, por ser de fácil aquisição devido ao seu baixo custo e apresentar adequadas propriedades físico-químicas.

Estudos clássicos relataram que o OZE não apresenta comportamento biológico favorável, sendo citotóxico, por conter eugenol em sua composição [10-13]. Portanto, o eugenol leva à resposta tecidual desfavorável [14, 15], provocando quadros de inflamação severa, necrose tecidual, perda tecidual direta, dermatite de contato e reação alérgica verdadeira em animais e seres humanos testados, nos diferentes níveis de pesquisa para avaliação da compatibilidade biológica dos materiais odontológicos [12, 16].

Os mastócitos têm papel relevante, na formação do tecido conjuntivo, liberação de mediadores que estimulam a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno [17]. Há uma relação entre a presença de mastócitos e fibrose demonstrada em estudos [18-20]. No entanto, relatos desta analogia, na reação do tecido conjuntivo frente ao cimento de OZE submetido à irradiação LBI não foram realizados.

A proposta deste estudo foi quantificar a densidade de tecido conjuntivo fibroso e a densidade de mastócitos nas reações do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos frente ao implante de tubos de polietileno contendo o cimento de OZE Endofill, quando submetidos à irradiação imediata e 24 horas do LBI.

MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA, da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Processo CEEA-FOAr N° 002/2005).

Foram utilizados 60 camundongos *Mus musculus albinus*, machos, pesando em média 40 gramas. Os animais foram anestesiados, por injeção intramuscular de cloridrato de cetamina - Ketamina 10% (Agener União Química Farmacêutica Nacional, Embu-Guaçu, SP, Brasil), anestésico geral na dosagem de 0,1 ml/100g de peso corpóreo, associado ao relaxante muscular e analgésico cloridrato de tiazina - Rompun (Bayer S.A. - Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) na dosagem de 0,04ml/100g de peso corpóreo.

Os animais foram colocados em mesa cirúrgica própria e imobilizados. Foi realizada a tricotomia na região dorsal média, com uma máquina elétrica (Wahl Clipper Corp, Model Mc, USA), completada por um aparelho de gilete com lâmina de aço inoxidável (Gillette do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Foi realizada anti-sepsia do campo operatório com detergente de mamona Endoquil (Poliquil, Polímeros Químicos Ltda., Araraquara, SP, Brasil).

Na linha média, eqüidistante da inserção da cauda e da cabeça do animal, foi realizada uma incisão transversal de aproximadamente 4mm de comprimento em relação

ao corpo do animal com tesoura cirúrgica de ponta fina. Com tesoura de ponta romba, foi realizado a divulsão lateral do tecido subcutâneo, confeccionado uma loja cirúrgica para acomodação do implante.

O Endofill foi preparado, obtendo-se uma mistura homogênea, seguindo as recomendações do fabricante (3 gotas de líquido adicionadas ao pó de forma gradativa até conseguir uma consistência tal que, ao colocar a espátula sobre a mistura e levantá-la formar-se um fio de cimento que se rompe quando atingir um comprimento de aproximadamente 2 cm). Os tubos de polietileno (Kit de selantes Delton - Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil), medindo 1,5mm de diâmetro interno; 2mm de diâmetro externo, 10mm de comprimento tiveram uma das extremidades fechada à quente. Os tubos e todo material clínico foram previamente autoclavados à temperatura de 120°C durante 20 minutos. Os tubos foram preenchidos com o material a ser testado, evitando a formação de bolhas com auxílio do instrumento Lentulo (Dentsply/Maillefer - Maillefer Instruments AS, Ballaigues, Switzerland) acionado por um motor elétrico (Nouvag TCM Endo, USA) numa rotação de 1000 RPM. Posteriormente foram implantados na loja cirúrgica, as bordas da ferida foram aproximadas e suturadas com Vicryl 4-0 estéril (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil). Os animais foram divididos eqüitativamente em 3 grupos (Tabela 1):

Tabela 1 - Distribuição dos grupos de acordo com o material testado, períodos experimentais e número de animais

Grupos	Material Testado	7 Dias	30 Dias	Total
I	Endofill sem LBI (controle)	10 animais	10 animais	20 animais
II	Endofill + LBI vermelho	10 animais	10 animais	20 animais
III	Endofill + LBI infravermelho	10 animais	10 animais	20 animais

Os grupos experimentais II e III receberam a irradiação LBI, imediatamente e 24 horas após o ato cirúrgico, colocando-se a ponta do cabo de fibra óptica o mais próximo possível da abertura do tubo, conforme os seguintes parâmetros: GII - LBI vermelho (InGaAlP) $\lambda 685\text{nm}$, $D=72\text{J}/\text{Cm}^2$, $E=2\text{J}$, $T=58\text{s}$, $P=35\text{mW}$; GIII - LBI infravermelho (AsGaAl) $\lambda 830\text{nm}$, $D=70\text{J}/\text{Cm}^2$, $E=2\text{J}$, $T=40\text{s}$, $P=50\text{mW}$. A Unidade LBI utilizada foi o Thera Lase (DMC, Equipamentos Ltda. E.P.P., São Carlos, SP, Brasil).

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas individuais, antes e após o procedimento cirúrgico e até a morte dos mesmos, sob condições controladas de limpeza, temperatura, umidade e luz, sendo alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*. Os animais não receberam medicação pós-operatória afim de não provocar resultados alterados. O estado geral dos animais foi avaliado diariamente.

Decorridos os períodos de 7 e 30 dias, os fragmentos teciduais contendo tecido cutâneo, subcutâneo e tubo de polietileno foram removidos com suficiente margem de segurança sob anestesia geral. Somente após a remoção destes fragmentos, os animais foram mortos por overdose anestésica de hidrato de cloral a 10%, a 0,4% ml por 100g de peso, injetado via intra-peritoneal, sendo colocados temporariamente no freezer e posteriormente incinerados.

Os fragmentos foram fixados em formalina a 10%, por 72 horas, desidratados, incluídos em parafina e seccionados em cortes histológicos de 6 μm em plano longitudinal, passando pela abertura do tubo de polietileno e incluindo toda interface entre o material e o tecido conjuntivo. As lâminas foram coradas com Picrosírius para fibrose e Azul de Toluidina para mastócitos [20].

A quantificação morfométrica de fibrose (Fig.1a) foi realizada, na parte correspondente a abertura do tubo. Foi utilizado um sistema analisador de imagem

automático constituído por microscópio, câmara capturadora de imagem e computador com o programa KS300 (Kontron Zeiss, Germany). Para avaliação morfológica do tecido conjuntivo fibroso foram utilizadas as lâminas coradas pela coloração de Picrosíruius, utilizando um filtro de luz polarizada e o sistema analisador de imagem automático descrito anteriormente. Utilizamos aumento final de 100x, sendo a imagem lançada no monitor. Na imagem polarizada o tecido conjuntivo fibroso apresentava birrefringência com coloração amarelo-avermelhada (Fig.1b), sendo dessa forma quantificado automaticamente. Foram avaliados todos os campos de cada caso.

A contagem dos mastócitos foi realizada em todas as lâminas, na parte correspondente a abertura do tubo. Para a quantificação dos mastócitos utilizamos as lâminas coradas pelo Azul de Toluidina (Fig.1c, Fig.1d), sendo observadas em um microscópio de luz comum, com aumento final de 1600x. Foi realizada contagem dos mastócitos em todos os campos dos cortes. Para a obtenção da área avaliada, com o auxílio uma ocular micrometrada calculamos a área de cada campo. Com o número de mastócitos e a área, calculamos a densidade de mastócitos, sendo expressa em número de mastócitos por mm^2 .

Os resultados foram submetidos à análise estatística pelos testes Kruskal-Wallis e teste de Comparação Múltipla de Dunn para fibrose, e ANOVA e teste de Tukey, para mastócitos, com o software SigmaStat 2.03.

RESULTADOS

Os dados morfológicos do padrão de fibrose e contagem de mastócitos obtidos do tecido conjuntivo subcutâneo dos animais foram analisados. O grupo irradiado com LBI infravermelho, não apresentou diferença no padrão de tecido conjuntivo fibroso em ambos

os períodos experimentais, quando comparado com grupo controle ($p>0,05$; Tabela 2 e Gráfico1).

O GII aos 7 dias não apresentou melhora no padrão de fibrose ($p>0,05$). No entanto, aos 30 dias mostrou um padrão inferior de tecido conjuntivo fibroso em relação ao GI 30 dias ($p<0,05$; Tabela 2 e Gráfico1).

Em ambos os períodos experimentais, 7 dias e 30 dias, a atuação do LBI vermelho e infravermelho reduziu de forma significativa ($p<0,05$) o valor médio de mastócitos em relação aos grupos controles 7 e 30 dias (Tabela 3 e Gráfico1).

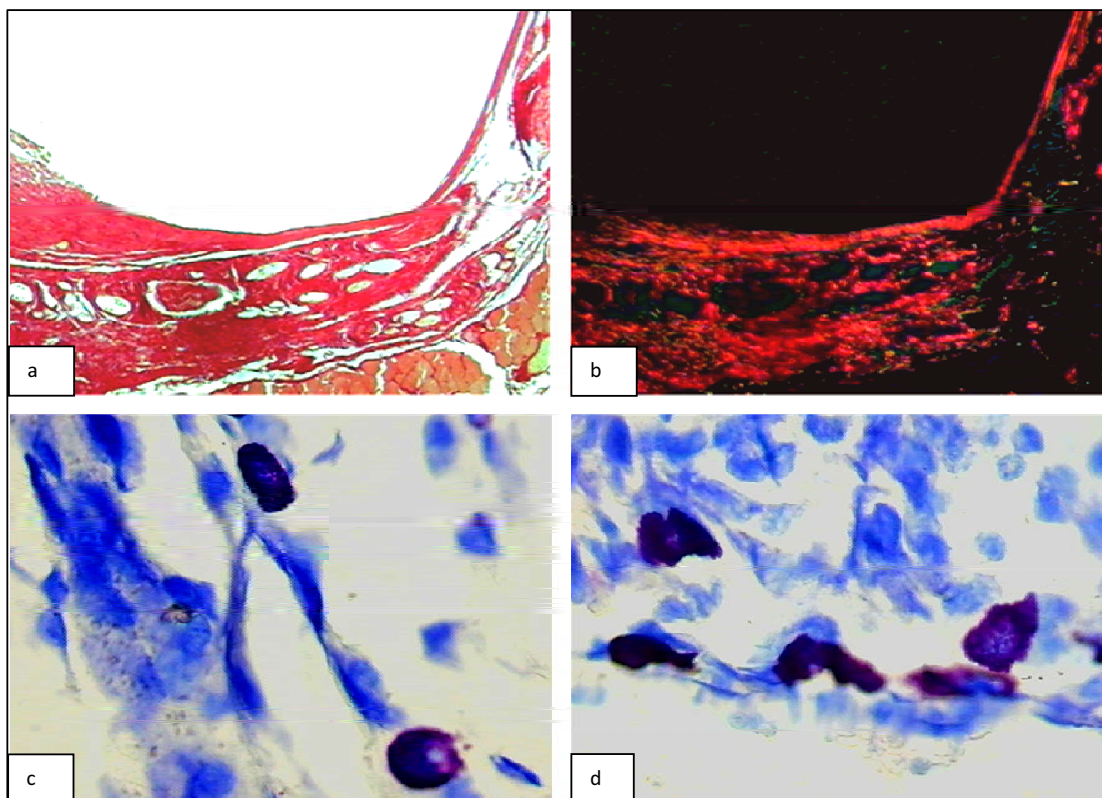


Figura 1 - Achados histológicos no tecido conjuntivo subcutâneo dos animais:

a - Tecido conjuntivo fibroso, em vermelho, ao longo da abertura do tubo, com finas fibras próximo ao cimento Endofill. Picrosirius, 100x.

b - Tecido conjuntivo fibroso, em vermelho, mostrando fibras colágenas maduras visíveis na abertura do tubo com alta birefringência. Picrosirius, luz polarizada, 100x.

c - Mastócitos na região onde se encontrava a reação tecidual frente ao cimento, Azul de Toluidina, 1600x.

d - Mastócitos sendo evidenciados na região da reação tecidual frente ao cimento Endofill, Azuis de Toluidina, 1600x.

Tabela 2 - Comparação estatística do padrão do tecido conjuntivo fibroso entre os grupos avaliados

Comparação	Diferença dos Ranks	Q	Valor de P<0,05
G III 30DIAS vs G III 7DIAS	456,219	16,301	SIM
G III 30DIAS vs G I 7DIAS	410,097	11,991	SIM
G III 30DIAS vs G II 7DIAS	351,407	11,078	SIM
G III 30DIAS vs G II 30DIAS	218,515	9,951	SIM
G III 30DIAS vs G I 30DIAS	70,358	2,207	NÃO
G I 30DIAS vs G III 7DIAS	385,861	11,314	SIM
G I 30DIAS vs G I 7DIAS	339,739	8,631	SIM
G I 30DIAS vs G II 7DIAS	281,049	7,549	SIM
G I 30DIAS vs G II 30DIAS	148,158	5,046	SIM
G II 30DIAS vs G III 7DIAS	237,703	9,475	SIM
G II 30DIAS vs G I 7DIAS	191,581	6,011	SIM
G II 30DIAS vs G II 7DIAS	132,891	4,551	SIM
G II 7DIAS vs G III 7DIAS	104,812	3,086	SIM
G II 7DIAS vs G I 7DIAS	58,690	1,496	NÃO
G I 7DIAS vs G III 7DIAS	46,122	1,271	NÃO

Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Comparação Múltipla de Dunn, com nível de significância de 5%, observados para os grupos Controle (GI), LBI vermelho (GII), LBI infravermelho (GIII).

Tabela 3 - Comparação estatística da quantificação de mastócitos entre os grupos avaliados

Comparações	Dif. das Médias	q	P	P<0,050
G I 7DIAS vs G III 30DIAS	4,375	12,846	<0,001	SIM
G I 7DIAS vs G II 30DIAS	3,819	11,213	<0,001	SIM
G I 7DIAS vs G III 7DIAS	3,333	9,786	<0,001	SIM
G I 7DIAS vs G II 7DIAS	2,916	8,562	<0,001	SIM
G I 7DIAS vs G I 30DIAS	1,181	3,468	0,157	NÃO
G I 30DIAS vs G III 30DIAS	3,194	9,378	<0,001	SIM
G I 30DIAS vs G II 30DIAS	2,638	7,746	<0,001	SIM
G I 30DIAS vs G III 7DIAS	2,152	6,319	<0,001	SIM
G I 30DIAS vs G II 7DIAS	1,735	5,094	0,009	SIM
G II 7DIAS vs G III 30DIAS	1,459	4,284	0,041	SIM
G II 7DIAS vs G II 30DIAS	0,903	2,651	0,429	NÃO
G II 7DIAS vs G III 7DIAS	0,417	1,224	0,953	NÃO
G III 7DIAS vs G III 30DIAS	1,042	3,060	0,272	NÃO
G III 7DIAS vs G II 30DIAS	0,486	1,427	0,913	NÃO
G II 30DIAS vs G III 30DIAS	0,556	1,633	0,856	NÃO

ANOVA seguido pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5%, observados para os grupos Controle (GI), LBI vermelho (GII), LBI infravermelho (GIII).

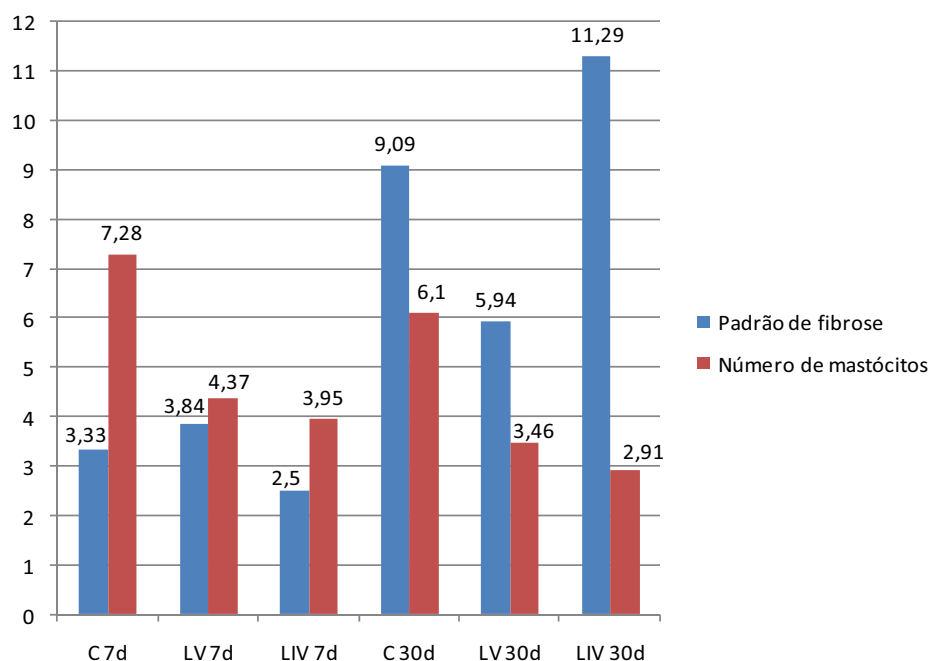


Gráfico 1 - Representação gráfica do padrão do tecido fibroso e número de mastócitos em GI, GII e GIII aos 7 e 30 dias.

DISCUSSÃO

Para que um cimento endodôntico seja dito “ideal”, este deve preencher diversas propriedades biológicas e físico-químicas, sendo as propriedades biológicas consideradas como as mais importantes. Por meio dos testes de biocompatibilidade verificamos se o material será bem tolerado pelos tecidos.

O cimento de OZE não apresenta comportamento biológico favorável [21], por conter em sua composição o eugenol. O eugenol livre seria responsável por danos teciduais, atuando como depressor celular [22, 23].

No presente estudo, utilizamos o LBI como um possível recurso tecnológico para minimizar o efeito irritante causado pelo cimento de OZE Endofill. Empregamos o LBI com a finalidade de realizar a bioestimulação, ou seja, oferecer à célula uma baixa intensidade de energia, que estimularia o reparo do tecido agredido.

Devido às ações terapêuticas dos LBI sobre os tecidos em induzir efeitos tais como, antiinflamatório, aumento na microcirculação local [24, 25], estímulo a drenagem linfática [26], proliferação de células epiteliais [27] e fibroblastos [28], bem como aumento da síntese de colágeno pelos fibroblastos [29], justifica-se o seu estudo com o propósito de promover a biomodulação no processo inflamatório mediante o efeito irritante do Endofill.

Foi utilizada a técnica de implantes de tubo de polietileno em tecido subcutâneo de camundongos, com intuito de avaliar *in vivo* a compatibilidade e as respostas biológicas do cimento Endofill. Esta metodologia é bastante conhecida e difundida na literatura, pois permite que o material a ser testado fique em contato direto com o tecido conjuntivo. Os resultados oriundos deste método podem ser usados como fontes pré-eliminarem para as informações da biocompatibilidade dos cimentos endodônticos [30-34].

Há estudos que demonstram relação entre a presença de fibrose e o número mastócitos na pele [17], no fígado [19], na língua de pacientes chagásicos [20], glândulas salivares [35]. Entretanto, não foi encontrado nenhum relato prévio, sobre a analogia da presença do padrão de fibrose com o número de mastócitos na reação do tecido conjuntivo ao cimento de OZE. Também não há estudos sobre a reação tecidual ao implante de tubos contendo o cimento de OZE e posteriormente irradiados com LBI.

Estudos têm demonstrado uma melhor resposta tecidual com a irradiação de LBI [8, 35]. Na presente pesquisa, demonstrou-se que a irradiação LBI vermelho interferiu de forma significativa o aumento no padrão de tecido fibroso aos 30 dias. Já o LBI infravermelho aos 30 dias apresentou padrão de tecido fibroso superior ao controle 30 dias, porém sem diferença estatística significante ($p > 0,05$). A divergência dos nossos resultados com os outros estudos, poderia ser justificada pela diferença nos parâmetros do LBI utilizados, já que estes ainda são controversos na literatura.

Há estudos que mostram a relação dos biomateriais em produzir efeitos inflamatórios *in vivo*, pois a reação inflamatória pode ser determinada por diferentes tipos de células, como por exemplo, os mastócitos [36]. A atuação do LBI vermelho ou LBI infravermelho, diminuiu de forma marcante o número de mastócitos aos 7 e 30 dias em comparação aos respectivos grupos controle.

Determinadas proteínas como metaloproteinase (MMP-2), podem induzir inflamação em resposta aos materiais odontológicos testados no tecido conjuntivo. Esse relato foi encontrado quando se avaliou o papel dos mastócitos e fibrose nesses materiais [37]. Em nosso estudo sugerimos também que MMP-2 pode estar envolvida na resposta biológica, contudo são necessários estudos para confirmar este resultado.

No entanto novas pesquisas para determinarem os melhores parâmetros para irradiação do LBI na resposta tecidual devem ser realizadas com a intenção de demonstrar a melhor relação do padrão fibrose e o número de mastócitos no reparo tecidual, frente ao cimento de OZE.

Os resultados deste estudo podem servir como um guia, para futuros trabalhos direcionados nesta linha de pesquisa, onde o mecanismo de ação da irradiação do LBI na reação do tecido conjuntivo ao cimento OZE ainda é desconhecido na literatura.

CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos de acordo com a metodologia empregada, podemos concluir que:

A irradiação LBI não ofereceu melhoria no padrão de fibrose, porém proporcionou queda significativa na concentração de mastócitos independente do período estudado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista (FOAr-UNESP) e Universidade de Uberaba (UNIUBE).

REFERÊNCIAS

- 1) Basford JR (1995) Low-intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med* 16:331-342.
- 2) Enwemeka CS, Reddy K (2000) The biological effects of laser therapy and other physical modalities on connective tissue repair processes. *Laser Ther* 12:22-30.
- 3) Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS (1998) Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med* 22:281-287.
- 4) Reddy GK, Gum S, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS (1998) Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part II. Effects of combined laser therapy and electrical stimulation. *Med Sci Sports Exerc* 30:794-800.
- 5) Enwemeka CS, Conhen-Kornberg E, Duswalt EP, Weber DM, Rodriguez IM (1994) Biomechanical effects of three different periods of GaAs laser photostimulation on tenotomized tendons. *Laser Ther* 6:181-188.

- 6) Salate ACB, Barbosa G, Gaspar P, Koeke PU, Parizotto NA, Benze BG, Foschiani (2005) Effect of In-Ga-Al-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. *Photomed Laser Surg.* 23:470-475.
- 7) Enwemeka CS (1992) Ultrastructural morphometry of membrane-bound intracytoplasmic collagen fibrils in tendon fibroblasts exposed to He-Ne laser beam. *Tissue Cell* 24:511-523.
- 8) Omi T, Kawana S, Sato S, Honda M (2003) Ultrastructural changes elicited by a non-ablative wrinkle reduction laser. *Lasers Surg Med* 32:46-49.
- 9) Heissig B, Rafii S, Akiyama H, Ohki Y, Sato Y, Rafael T, Zhu Z, Hicklin DJ, Okumura K, Ogawa H, Werb Z, Hattori K (2005) Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9-mediated progenitor cell mobilization *J Exp Med* 202:739-750.
- 10) Spangberg L, Langeland K (1973) Biologic effect of dental materials: 1. Toxicity of root canal filling materials on HeLa cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 35:402-414.
- 11) Langeland K (1974) Root canal sealants and pastes. *Dent Clin North Am* 18:309-327.
- 12) Lindquist L, Otteskog P (1980) Eugenol: liberation from dental materials and effect on human diploid fibroblast cells. *Scand J Dent Res* 88:552-556.
- 13) Hume WR (1984) Effect of eugenol on respiration and division in human pulp, mouse fibroblasts, and liver cells in vitro. *J Dent Res* 63:1262-1265.
- 14) Hensten-Pettersen A, Helgeland K (1977) Evaluation of biologic effects of dental materials using four different cell culture techniques. *Scand J Dent Res* 85:291-296.

- 15) Leonardo MR, Silva LA, Almeida WA, Utrilla LS (1999) Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol* 15:28-32.
- 16) Barkin ME, Boyd JP, Cohen S (1984) Acute allergic reaction to eugenol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 57:441-442.
- 17) Garbuzenko E, Nagler A, Pickholtz D, Gillery P, Reich R, Maquart FX, Levi-Schaffer F (2002) Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells skin fibrosis. *Clin Exp Allergy* 32:237-246.
- 18) Jordana M (1993) Mast cells and fibrosis-who's on first? *Am J Respir Cell Mol Biol* 8:7-8.
- 19) Jeong WL, Lee CS, Park SJ, Chung JY, Jeong KS (2002) Kinetics of macrophages, myofibroblasts and mast cells in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhosis. *Anticancer Res* 22:869-877.
- 20) Pereira SAL, Santos VM, Rodrigues DBR, Cunha-Castro EC, Reis MA, Teixeira VPA (2007) Quantitative analysis of fibrosis and mast cells in the tongue of chronic chagasic patients: autopsy study. *Med Mal Infect* 37:229-233.
- 21) Barbosa SV, Araki K, Spangberg LS (1993) Cytotoxicity of some modified root canal sealers and their leachable components. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 75:357-361.
- 22) Leonardo MR, Utrilla LS, Rothier A, Leonardo RT, Consolaro A (1990) Comparison of subcutaneous connective tissue responses among three different formulations of gutta-percha used in thermatic techniques. *Int Endod J* 23:211-217.

- 23) Yesilsoy C, Koren LZ, Morse DR, Kobayashi C (1988) A comparative tissue toxicity evaluation of established and newer root canal sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 65:459-467.
- 24) Maier M, Haina D, Landthaler, M (1990) Effect of low energy laser on the growth and regeneration of capillaries. *Lasers Med Sci* 5:381-386.
- 25) Miró L, Coupe M, Charras C, Jambon C, Chevalier JM (1984) Estudio capiloscópico de la acción de un láser de AsGa sobre la microcirculación. *Inv Clin Laser* 1:9-14.
- 26) Lievens PC (1991) The effect of I.R. Laser irradiation on the vasomotricity of the lymphatic system. *Laser Med Sci* 6:189-191.
- 27) Steinlechner CWB, Dyson M (1993) The effects of low level laser therapy on the proliferation of keratinocytes. *Laser Ther* 5:65-73.
- 28) Webb C, Dyson M, Lewis WHP (1998) Stimulatory effect on 660 nm low level laser energy on hypertrophic scan-derived fibroblasts: Possible mechanisms for increase in cell culture. *Lasers Surg Med* 22:294-301.
- 29) Skinner SM, Gage JP, Wilce PA, Shaw RM (1996) A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. *Aust Dent J* 41: 188-192.
- 30) Torneck CD (1966) Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. Part I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 21:379-387.
- 31) Torneck CD (1967) Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. Part II. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 24:674-683.
- 32) American Dental Association Council on Dental Materials and Devices of the American Dental Association. (1972) Biologic effect of dental materials. *J Am Dent Assoc* 84:375-395.

- 33) American National Standards Institute/American Dental Association (1982) Specification n°41° for recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. New York: ANSI/ADA; 1982.
- 34) International Organization For Standardization. Dentistry (1997) Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. Test methods for dental materials: ISO/TR 7405-1997(E). Switzerland: ISO, 1997.
- 35) Ellis DL (1996) Treatment of telangiectasia macularis eruptiva perstans with the 585-ηm flashlamp-pumped dye laser. *Dermatologic Surg* 22:33-37.
- 36) Rezzani R, Rodella LF, Tartaglia GM, Paganelli C, Sapelli P, Bianchi R (2004) Mast cell and the inflammatory response to different implanted biomaterials. *Arch Histol Cytol* 67:211-217.
- 37) Rodella LF, Rezzani R, Buffoli B, Bonomini F, Tengattini S, Laffranchi L, Paganelli C, Sapelli PL, Bianchi R. Role of mast cells in wound healing process after glass-fiber composite implant in rats. *J Cell Mol Med* 10:946-954.

“A persistência supera o que os fracos consideram impossível”

Tácito

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Nas condições experimentais em que esta pesquisa foi conduzida, de acordo com a metodologia empregada e com base nos resultados obtidos nos permitem concluir que:

- 1) O tecido conjuntivo reagiu de forma mais favorável ao cimento Endofill, quando submetido à irradiação do LBI, no período de 7 dias. Aos 30 dias ocorreu reparo tecidual, independente da utilização do LBI.
- 2) Entre os grupos irradiados com LBI, o GIII (LBI infravermelho) apresentou melhores resultados histológicos, quando comparado com o GII (LBI vermelho), porém sem diferença estatística significativa tanto aos 7 como aos 30 dias.
- 3) Nos grupos onde houve irradiação do LBI, houve menor número de mastócitos e menor presença de fibrose, principalmente no GIII (LBI infravermelho), conseqüentemente, abreviou-se o tempo do processo de cicatrização e reparo tecidual.

“Todos os dias temos motivos pra agradecer!!!

Aprendemos com a vida...

Que é necessário viver cada dia como se fosse único.

Que temos a liberdade de fazer as nossas escolhas.

Que o conhecimento precisa ser aprimorado a cada dia”

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS *

1. Almeida-Lopes L. Laserterapia na odontologia. *Biodonto*. 2004; 1:9-90.
2. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med*. 2001; 29:179-84.
3. Al-Watban FAH, Zhang Z. Dosimetry-related wound healing response in the rat model following helium neon laser LLLT. *Laser Ther*. 1994; 6:119-24.
4. American Dental Association. Council on Dental Materials and Devices of the American Dental Association. Biologic effect of dental materials. *J Am Dent Assoc*. 1972; 84:375-95.
5. American National Standards Institute. American Dental Association specification N°41 for recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. New York: ANSI/ADA; 1982.
6. Bagnato VS. Os fundamentos da luz laser. *Física Esc*. 2001; 2:4-9.
7. Barbosa SV, Araki K, Spangberg LS. Cytotoxicity of some modified root canal sealers and their leachable components. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1993; 75:357-61.
8. Barkin ME, Boyd JP, Cohen S. Acute allergic reaction to eugenol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1984; 57:441-2.
9. Bihari J, Mester AR. The biostimulative effect of low level laser therapy on longstanding crural ulcers using Helium Neon Laser, Helium Neo Laser Plus

* De acordo com Vancouver. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- infrared lasers, and noncoherent light: preliminary report of a randomised double blind comparative study. *Laser Ther.* 1989; 1:97-102.
10. Diao GX. Quantitative analysis for mast cells in obstructive sialadenitis. *Zhonghua Kou qiang Yi Xue Za Zhi.* 1993; 28:93-94.
 11. Enwemeka CS, Rodriguez O, Gall N, Walsh N. Morphometries of collagen fibril populations in He-Ne laser photostimulated tendons. *J Clin Laser Med Surg.* 1990; 8:151-6.
 12. Garbuzenko E, Nagler A, Pickholtz D, Gillery P, Reich R, Maquart FX, et al. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collage synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells skin fibrosis. *Clin Exp Allergy.* 2002; 32:237-46.
 13. Garcia VG, Okamoto T, Kina JR. Reparação das feridas cutâneas submetidas ao tratamento com raio laser. Estudo histológico em ratos. *Rev Odontol UNESP.* 1996; 25:37-48.
 14. International Organization for Standardization. Dentistry - preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. Test methods for dental materials: ISO/TR 7405-1997(E). Switzerland: ISO, 1997.
 15. Jordana M. Mast cells and fibrosis - who's on first? *Am J Respir Cell Mol Bio.* 1993; 8:7-8.
 16. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido conjuntivo. In: Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica.* 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.92-124.
 17. Karu TI. Effects of visible radiation on cultured cells. *Photochem Photobiol.* 1990; 52:1089-98.
 18. Karu TI. Low-power laser therapy. *Biomedic Photonic.* 2003; 48:1-26.
 19. Knappe V, Frank F, Rohde E. Principles of lasers and biophotonic effects.

- Photomed Laser Surg. 2004; 22:411-7.
20. Koch G, Magnusson B, Nobreus N, Nyquist G, Soderholm G. Contact allergy to medicaments and materials used in dentistry. Sensitizing effect of eugenol-coloophony in surgical dressing. *Odontol Revy.* 1973; 24:109-14.
21. Kujawa J, Zavodnik L, Zavodnik I, Buko V, Lapshyna A, Bryszewska M. Effect of low-intensity (3.75-25 J/cm²) near-infrared (810 nm) laser radiation on red blood cell ATPase activities and membrane structure. *J Clin Laser Med Surg.* 2004; 22:111-7.
22. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Inflamação aguda e crônica. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Robbins & Cotran bases patológicas das doenças.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.49-89.
23. Langeland K, Guttuso J, Langeland LK, Tobon G. Methods in the study of biologic response to endodontic materials. *Oral Surg.* 1969; 27:522-42.
24. Leal JM. Materiais obturadores de canais radiculares. In: Leonardo MR. *Endodontia - tratamento de canais radiculares.* São Paulo: Artes Médicas; 2005. p.1063-145.
25. Leonardo MR. Endodontia, considerações iniciais, definição, importância. In: Leonardo MR. *Endodontia - tratamento de canais radiculares.* São Paulo: Artes Médicas; 2005. p.1-20.
26. Lievens PC. The effect of ir laser irradiation on the vasomotricity of the lymphatic system. *Laser Med Sci.* 1991; 6:189-91.
27. Lindqvist L, Otteskog P. Eugenol: liberation from dental materials and effect on human diploid fibroblast cells. *Scand J Dent Res.* 1980; 88:552-6.
28. Lizarelli RFZ. *Protocolos clínicos odontológicos - uso do laser de baixa intensidade.* São Carlos: Bons Negócios; 2005.

29. Lubart R, Friedmann H, Sinykov M, Grossman N. Biostimulation of photosensitized fibroblasts by low incident levels of visible light energy. *Laser Ther.* 1995; 7:101-6.
30. Maier M, Haina D, Landthaler, M. Effect of low energy laser on the growth and regeneration of capillaries. *Lasers Med Sci.* 1990; 5:381-6.
31. Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature.* 1960; 187:493-4.
32. Makkes PC, Van Velzen SKT, Wesselink PR, Greeve PCM. Polyethylene tubes as a model for the root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1977; 44:293-300.
33. Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg.* 1971; 122:532-35.
34. Miró L, Coupe M, Charras C, Jambon C, Chevalier JM. Estudio capiloscópico de la acción de un láser de AsGa sobre la microcirculación. *Inv Clin Laser.* 1984; 1:9-14.
35. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med.* 2005; 36:8-12.
36. Pereira SAL, Santos VM, Rodrigues DMR, Cunha-Castro EC, Reis MA, Teixeira VPA. Quantitative analysis of fibrosis and mast cells in the tongue of chronic chagasic patients: autopsy study. *Med Mal Infect.* 2007; 37:229-33.
37. Reddy GK. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J Clin Laser Med Surg.* 2004; 22:141-50.
38. Rodrigues HH, Spangberg L, Langeland. Efeitos biológicos de pastas obturadoras de canal sobre células HeLa in vitro. *Rev Endodoncia.* 1976; 1:3-8.
39. Skinner SM, Gage JP, Wilce PA, Shaw RM. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. *Aust Dent J.* 1996; 41:12-9.

40. Steinlechner CWB, Dyson M. The effects of low level laser therapy on the proliferation of keratinocytes. *Laser Ther.* 1993; 5:65-73.
41. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LAB, Utrilla LS. Effect of different root canal sealers on periapical repair of teeth with chronic periradicular periodontitis. *Int. Endod. J.* 1998; 31:85-89.
42. Torneck C. Reaction of rat connective tissue polyethylene tube implants. Part I. *Oral Surg.* 1966; 21:379-87.
43. Torneck C. Reaction of rat connective tissue polyethylene tube implants. Part II. *Oral Surg.* 1967; 24:674-83.
44. Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry.* 2004; 69:81-90.
45. Webb C, Dyson M, Lewis WHP. Stimulatory effect on 660 nm low level laser energy on hypertrophic scan-derived fibroblasts: Possible mechanisms for increase in cell culture. *Lasers Surg Med.* 1998; 22:294-301.


“Entrega o teu caminho ao Senhor, confia nele, e ele tudo fará.”

Salmo 37,5

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1 - Certificado do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA e Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA, da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Processo CEEA-FOAr N° 002/2005)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Odontologia
Campus de Araraquara

Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nr. 31/2004 referente à pesquisa "Avaliação histopatológica do efeito do laser de baixa intensidade na resposta do tecido subcutâneo de camundongos a implantes com cimento endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol" sob a responsabilidade de *Gustavo Sivieri de Araújo e Fabio Luiz Camargo Villela Berbert* está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP em reunião de 18/04/2006

CERTIFICATE

We certify that the protocol 31/2004 referring to the research "Histopatologic evaluation of low intensity laser effect in the response of the subcutaneous tissue of mice to implants with endodontic zinc oxide eugenol based cement" under responsibility of *Gustavo Sivieri de Araújo and Fabio Luiz Camargo Villela Berbert* is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Araraquara Dental School-UNESP Ethica Committee for Animal Research (CEEA) in April 18, 2006.

Araraquara, 18 de abril de 2006



Prof. Dra. Maria Rita Brancini de Oliveira
Coordenadora do CEEA/FOAr/UNESP

16

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

Araraquara, 27 de março de 2008.

GUSTAVO SIVIERI DE ARAÚJO