

Sonia Amalia Rodríguez Sosa

***Reação histopatológica do tecido conjuntivo do dorso de
ratos irradiado com laser de CO₂ ou de Er:YAG***

*Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Araraquara da
Universidade Estadual Paulista para a
obtenção do título de Mestre em
Odontologia, área de Endodontia.*

Orientador

Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert

Co-Orientador

Prof^a. Dra. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho

ARARAQUARA

2004

Sonia Amalia Rodríguez Sosa

Dados Curriculares

Nascimento	30 de setembro 1972 Santo Domingo – República Dominicana
Filiação	Ramón Rodríguez Sosa Sonia Sosa de Rodríguez
1990/1996	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Nacional Pedro Henríquez Ureña (República Dominicana).
2002/2004	Curso de Pós-graduação em Odontologia, Área de Endodontia, Nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.

Dedicatória

Dedico este trabalho a

A Deus, por sua eterna companhia.

A meus pais Ramón e Sonia, por incentivar-me a empreender esta ambiciosa meta, pelo amor incondicional e por permanecerem cerca de mim, mesmo estando longe.

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert**, cuja orientação trouxe respeito e admiração.

À **Prof^a. Dra. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho**, pela atenção, ensinamentos e importante contribuição na elaboração do presente trabalho.

Aos professores da disciplina de Endodontia **Dr. Mário Roberto Leonardo, Fábio Luiz Camargo Villela Berbert, Dr. Mário Tanomaru, Dr. Idomeo Bonetti Filho, Dr. Renato de Toledo Leonardo e Dr. Roberto Miranda Esberard** pelas orientações e pelos conhecimentos transmitidos.

À **Prof^a. Dra. Rossane de Fátima Zanirato Lizareli** por sua importante colaboração na realização deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista –UNESP, na pessoa de seu diretor **Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached** e de seu Vice-diretor **Prof. Dr. Roberto Miranda Erberard** pela oportunidade concedida para a realização do curso de mestrado.

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de estudo.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, **Luiz Antonio Potenza** pela amizade e colaboração, e **Pedro Sérgio Simões**, pelo tempo e esforço dedicado ao processamento histológico e pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Endodontia **Célia, Pedro, Marinho** por estarem sempre dispostos a atender qualquer solicitação.

A **todos os funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araraquara, **especialmente da secção de pós-graduação e da biblioteca**, que me ajudaram com presteza e boa vontade no decorrer do curso.

A meus colegas do curso de Pós-Graduação **Cristiane, Denisse, Roberta, Fernanda, José Carlos, Henrique, Renata, Erick e Ronaldo** pela amizade e colaboração, colegas maravilhosos com os quais tive o prazer de dividir estes anos.

A **Esmeralda, Ana Maria, Patricia, Marcia e Maura**, pelos momentos felizes compartilhados.

À família **Bonanato Estrela** por ter-me acolhido com tanto carinho.

A **Dona Emilia**, por ter sido como uma mãe sempre carinhosa.

A todos os brasileiros que me ofereceram ajuda e amizade.

Muito obrigada!!

Resumo

Resumo

Rodriguez Sosa, S. A. **Reação histopatológica do tecido conjuntivo do dorso de ratos irradiado com laser de CO₂ ou de Er:YAG.** Araraquara, 2004. 98p. Dissertação (Mestrado em Endodontia) Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

O presente estudo avaliou a reação do tecido conjuntivo irradiado com os lasers de CO₂ e de Er:YAG em feridas confeccionadas no dorso de ratos. Foram confeccionadas 2 feridas no dorso de 30 ratos com um *punch* de 3mm de diâmetro. Os animais foram divididos em três grupos de 10: no Grupo I as feridas foram irradiadas com o laser de CO₂, λ 10,6 μ m, (1,5 W -50 Hz); no Grupo II as feridas foram irradiadas com o laser de Er:YAG, λ 2,94 μ m (300 mJ -10 Hz), tempo de irradiação de 23 segundos em ambos os grupos; e no grupo III as feridas não foram submetidas à irradiação. Após o ato operatório, todas as feridas foram forradas com MTA. Os animais foram mortos em períodos de 1 dia e 7 dias e as peças removidas, processadas, coradas com hematoxilina / eosina e analisadas no microscópio óptico. Aos 7 dias, no grupo do Er:YAG foi observada a presença de tecido de granulação, porém no grupo do CO₂ ainda houve uma severa reação inflamatória com áreas de necrose tecidual. No grupo controle não houve inflamação aos 7 dias na maioria dos casos. Conclusão: os resultados obtidos no presente estudo nos permitem afirmar que o tecido conjuntivo reagiu de forma mais favorável à irradiação laser de Er:YAG do que à irradiação do laser de CO₂, independentemente do tempo pós-operatório.

Palavras-chave: lasers, tecido conjuntivo, dióxido de carbono.

Abstract

Abstract

RODRIGUEZ SOSA, S. A. **Histopathologic reaction of connective tissue in rat wounds irradiated with CO₂ or Er:YAG lasers**. Araraquara, 2004. 98p. Dissertação (Mestrado em Endodontia) Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

The present study assessed the connective tissue reaction after irradiation with CO₂ and Er:YAG lasers in the back of rats. Two wounds were practiced in the back of thirty rats with a 3mm diameter punch. The animals were divided into three groups of ten specimens each: In Group I the wounds were irradiated with a CO₂ laser, λ 10,6 μ m, (1,5 W -50 Hz) ; In Group II the wounds were irradiated with a Er:YAG laser, λ 2,94 μ m, (300 mJ -10 Hz), in both groups the irradiation time was of 23 seconds; Group III received no irradiation. After the intervention, all wounds were covered with MTA. The specimens were killed after intervals of 1 to 7 days and samples collected, processed and stained with hematoxylin/eosin, and analyzed under the light microscope. At seven days period the Er:YAG group exhibited granulation tissue proliferation, while in the CO₂ group a severe inflammatory reaction persisted with areas of necrosis. In the control group there was no inflammation in most of the cases after 7 days period. Conclusions: The results yielded by the present study lead us to assure that the reaction of the connective tissue was most favorable to irradiation with Er:YAG laser than with CO₂ laser, regardless the time elapsed after the intervention.

Key words: lasers, connective tissue, carbon dioxide.

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Revisão da Literatura	18
3. Proposição	39
4. Material e Método	41
5. Resultado	51
6. Discussão	71
7. Conclusão	85
8. Referências	87
Glossário	96

Introdução

1. Introdução

O laser foi desenvolvido no ano de 1960 por Theodore Mairman, baseado na teoria da emissão estimulada de radiação descrita por Einstein em 1917.^{52,55} A palavra laser é um acrônimo de *light amplification by stimulated emission of radiation* (luz amplificada por emissão estimulada de radiação) e descreve um aparelho que gera radiação eletromagnética. Sua energia consiste de um feixe de luz com características especiais, das quais as mais importantes são a intensidade, a monocromaticidade, a coerência e a colimação^{5,16}, características que lhe permitem depositar uma grande quantidade de energia eletromagnética nos tecidos com extrema precisão. Integrado à atividade odontológica no ano 1968, o laser tem sido proposto e utilizado como substituto de terapias convencionais. Na atualidade, é amplamente utilizado no campo da medicina e da odontologia revolucionando, em muitos aspectos, as terapias de prevenção e tratamento.

Duas categorias de lasers são freqüentemente utilizadas na medicina e na odontologia, os de baixa intensidade de energia, também chamados *soft lasers*, e os de alta intensidade de energia, também chamados *hard lasers* ou cirúrgicos. Os lasers de baixa intensidade proporcionam uma energia atômica, atuando no local da irradiação com efeito antiinflamatório, analgésico e bioestimulante^{45,49}. Já os lasers de alta intensidade de energia são sistemas de efeito térmico e provocam um aumento de temperatura no local irradiado. Têm sido utilizados em procedimentos cirúrgicos pelo grande poder de corte, ablação e coagulação, na dependência do tipo de tecido e das características específicas do feixe.

Na Odontologia, o laser tem sido estudado em diferentes aplicações: diagnóstico e remoção da cárie ^{35,36}, redução bacteriana do canal radicular ⁴², raspagem e alisamento radicular ^{2,46}, fotopolimerização de resinas ⁷⁸, procedimentos cirúrgicos ^{51,53}, estimulação da cicatrização, ação antiinflamatória e analgésica ⁴⁹, entre outras.

Dentre os lasers cirúrgicos, o laser de CO₂ é o mais utilizado e aceito como método alternativo das técnicas cirúrgicas bucais convencionais ^{1,6,15,20,76,77}, assim como o laser de Er:YAG é utilizado na remoção de tecido duro dentário. ^{13, 84}

O laser de dióxido de carbono emite um feixe contínuo de um comprimento de onda de 10,6 µm na região infravermelha invisível do espectro eletromagnético. Sua energia é absorvida pela água quando posto em contato direto com o tecido. O efeito térmico do laser de CO₂ é resultado do super aquecimento do tecido alvo, contudo de forma superficial, ocorrendo para o tecido mole vaporização, necrose superficial, coagulação e desnaturação protéica, efeitos que são produto da interação da luz com o tecido alvo (absorção). ^{7,40}

O laser de Er:YAG emite um feixe pulsado de um comprimento de onda de 2,94 µm na proximidade da região infravermelha do espectro eletromagnético. Nesse comprimento existe a mais alta absorção pela água. Quando utilizado em tecidos vivos com suficiente conteúdo hídrico, esse laser provoca uma rápida vaporização das camadas superficiais do tecido. A ação do Er:YAG está baseada no processo de ablação termomecânica, que permite a remoção de tecido com mínima agressão térmica aos tecidos adjacentes. ^{28,66}

Segundo Ayhan et al.⁴ (2002), o laser de Er:YAG pode provocar ablação com controle da quantidade de tecido a ser removida.

A irradiação de alta intensidade de energia mostra-se efetiva na remoção superficial de tecido (ablação) e no corte (incisão). Em tecidos como o epitelial e o conjuntivo, áreas de necrose, de coagulação e de tecido não agredido têm sido observadas no local da irradiação, ocorrendo também uma reação inflamatória como resposta à agressão.^{41,63,7} A resolução da inflamação e a cronologia do reparo são diretamente relacionadas com a quantidade de energia depositada no local.

Na área da Endodontia, os lasers têm sido estudados no tratamento conservador da vitalidade pulpar, encontrando-se na literatura referências ao uso dos sistemas de baixa intensidade em capeamentos pulpares e pulpotomias, com efeito estimulador da formação de tecido mineralizado.^{11,74} Quanto aos lasers de alta intensidade, Arrastia et al.³ (1995) e Shoji et al.⁶⁸ (1985) afirmaram que existe a possibilidade de seccionar a polpa dental com o laser de CO₂ sem causar hemorragia, agressão mecânica ou contaminação bacteriana, aumentando as possibilidades de sucesso nas pulpotomias. Dang et al.¹² (1998) também afirmaram que o laser de CO₂, utilizado com os parâmetros apropriados, preenche os requisitos necessários para realizar pulpotomias com sucesso, já que tem a capacidade de remover de maneira atraumática o tecido pulpar preservando o tecido remanescente.

Segundo Melcer et al.⁴⁴ (1985) e Nammour⁴⁸ (1994), a irradiação do laser de CO₂ pode ativar os odontoblastos e estes poderão vir a produzir dentina reacional. A necrose superficial produzida na área irradiada, como consequência do

efeito térmico, pode preservar a polpa da invasão bacteriana. Entretanto, alguns autores tiveram resultados insatisfatórios nas suas pesquisas. Figueiredo et al.²¹ (1995) observaram hemorragia após a irradiação da polpa coronária, e Jukic et al.³² (1997), necrose por coagulação da polpa radicular após a irradiação das entradas dos canais radiculares com os lasers de CO₂ e de Nd:YAG.

A proposta de uso dos lasers cirúrgicos no tratamento conservador da vitalidade pulpar está baseada nas habilidades desses sistemas para remover tecido de maneira superficial em tempo operatório reduzido, sem sangramento, com escasso trauma mecânico, oferecendo ainda efeito bactericida local.

Pouco tem-se estudado o laser de Er:YAG em tratamentos conservadores da vitalidade pulpar. Jawardena et al.³¹ (2001) observaram, no período de duas semanas, uma maior formação de dentina reparadora e tecido pulpar de características normais em exposições pulpares realizadas com o laser de Er:YAG, em comparação com a baixa rotação.

Na atualidade, não se tem referência da utilização dos lasers cirúrgicos na completa remoção da polpa coronária. A prática tem se limitado à irradiação das entradas dos canais radiculares após a remoção da polpa coronária com escavador ou broca. Para seccionar a polpa dental, é de grande importância a escolha de um sistema laser que, pelas características físicas da luz e sua interação com o tecido, minimize a agressão aos tecidos adjacentes. Também, faz-se necessário determinar parâmetros seguros de irradiação que sejam efetivos na remoção da polpa coronária sem causar danos irreversíveis ao tecido pulpar remanescente, deixando um tecido viável para o reparo. A rápida absorção superficial dos comprimentos de onda dos lasers de CO₂ e de Er:YAG no tecido

conjuntivo, com uma grande quantidade de água, permite uma ação bem localizada com áreas de agressão térmica na ordem dos micrômetros. Em estudo piloto foi avaliada a ação de diferentes tipos de lasers cirúrgicos em tecido conjuntivo, dos quais o Er:YAG, nos diferentes parâmetros utilizados, apresentou os melhores resultados.⁶⁰

Diante desses fatos, foi objetivo do presente trabalho avaliar a reação do tecido conjuntivo do dorso de ratos, diretamente irradiado com os lasers de CO₂ e de Er:YAG utilizando parâmetros pré-estabelecidos para a remoção do tecido conjuntivo.

Revisão da Literatura

2. Efeitos do laser no tecido mole

Duarte et al.¹⁴ (1984) avaliaram os efeitos do laser de CO₂ sobre os tecidos gengivais em ratos. As irradiações foram realizadas na papila vestibular dos incisivos superiores com o sistema Sharplan-733, 10 W e 15 W de potência, e tempo de irradiação de 0,05 segundos, 0,1 segundos, 0,2 segundos e 0,5 segundos. Imediatamente após as irradiações, os animais foram mortos e o material, processado para análise histológica. Macroscopicamente pôde-se observar uma queimadura no local da irradiação. O fenômeno histopatológico básico exibido pelo tecido gengival variou de necrose do tipo coagulação até o desaparecimento, em diversas profundidades, da estrutura tecidual. O epitélio de revestimento ora estava ausente, deixando o tecido conjuntivo desnudo e recoberto por material amorfo eosinofílico, ora exibia necrose, com manutenção de sua arquitetura básica. A lâmina própria subjacente ao tecido epitelial lesado esteve necrosada. Também houve rompimento de vasos sanguíneos com derrame de hemácias e congestão de vasos íntegros na área da lesão. A irradiação de 10 W de potência e tempo de 0,2 segundos foi menos lesiva para os tecidos gengivais. Os autores concluíram que o grau da lesão é diretamente proporcional ao aumento da potência e ao tempo de exposição.

Segundo Frame¹⁹ (1985), o laser de dióxido de carbono é um instrumento de utilidade cirúrgica na eliminação de lesões de tecido mole. O laser de CO₂ destrói tecido de uma maneira precisa e relativamente sem sangramento. A energia do laser vaporiza o fluido intra e extracelular causando a desintegração da

estrutura celular. Os pequenos vasos sanguíneos são selados espontaneamente, permitindo ao cirurgião uma excelente visibilidade e precisão durante o ato cirúrgico. O feixe do laser causa uma destruição localizada, e o tecido ao redor da área de impacto sofre pequenas alterações. A ferida é geralmente coberta por tecido carbonizado e, após 24 horas, por um coágulo fibrinoso. A reação inflamatória aguda é mínima e, durante a cicatrização, alguns miofibroblastos e fibras colágenas estão presentes.

Em 1986, Luomanen & Meurman⁴¹ compararam os processos de cicatrização de feridas realizadas com o laser de CO₂ ou bisturi na mucosa bucal de ratos. O aparelho utilizado foi o Laser CO₂ Lasertek, 6 W de potência, emissão contínua. Os animais foram mortos imediatamente, 4, 7, 11 e 21 dias após as irradiações. As peças foram removidas e submetidas à tramitação laboratorial para análise histológica no microscópio eletrônico. Nas feridas a laser observou-se a formação de uma cratera com partículas de tecido carbonizado e necrosado, e as células epiteliais mostraram-se transtornadas, sem detalhe na sua morfologia. Diretamente embaixo da cratera, o tecido conjuntivo foi degradado com fibras colágenas rotas e remanescentes celulares; porém, a 1 mm de profundidade, o tecido mostrou-se com normalidade. Houve grande quantidade de células inflamatórias, e a cicatrização foi ligeiramente retardada. A injúria provocada no tecido ao redor da área irradiada foi reduzida. Aos 21 dias, a reepitelização foi completa, observando-se ainda dano celular. Nas feridas realizadas com bisturi, houve inflamação crônica suave, não houve necrose e ocorreu completa cicatrização aos 11 dias. Os autores concluíram que houve uma marcada diferença

entre os dois tipos de incisões. A resposta inflamatória foi mais severa e o processo de reparo mais lento nas incisões realizadas com laser.

Num estudo similar ao anterior Luomanen⁴⁰ (1987) comparou a reação inflamatória em feridas realizadas com o bisturi e com o laser de CO₂ na mucosa lingual de ratos. As feridas do grupo laser foram feitas utilizando uma emissão contínua de 10 W e feixe focalizado. Segundo a análise histológica, houve uma pequena quantidade de células inflamatórias no período de 6 horas incrementando-se no período de dois dias. Também foi observada a formação de uma cratera e a ruptura das paredes de alguns vasos sanguíneos provocando uma suave hemorragia. Entretanto, uma pequena quantidade de vasos sanguíneos a distância da lesão se achava sem nenhuma alteração. Nas feridas realizadas com bisturi, foi observada uma reação inflamatória de moderada a severa. Houve proliferação de vasos sanguíneos nos dois tipos de feridas no período de dois dias. Aos 28 dias não houve inflamação no grupo laser e houve completa cicatrização das feridas realizadas com bisturi. Os autores concluíram que o infiltrado inflamatório aparece mais devagar, porém mais proeminente no processo de reparo das feridas realizadas com laser.

Rossmann et al.⁶³ (1987) afirmaram que o laser de CO₂ pode ser utilizado na completa remoção da mucosa gengival, deixando o tecido conjuntivo intacto e viável. Os autores irradiaram áreas de 2 mm de diâmetro da gengiva inserida de um canino superior de um macaco. O aparelho utilizado foi o CO₂ Model 400, potência de 10 W, distância focal de 40 mm, em tempos de irradiação de 0,2 segundos e 0,5 segundos. A gengiva carbonizada, consequência da irradiação, foi removida, processada e analisada histologicamente. Em ambos os períodos de

tempo observou-se a formação de uma cratera, destruição epitelial e degradação de colágeno, sem hemorragia, extravasamento de células vermelhas do sangue ou infiltrado inflamatório. O tecido conjuntivo 1 mm abaixo da área irradiada apresentou mínima ou nenhuma alteração. Sob as condições do estudo, 0,5 segundos de irradiação foi suficiente para a completa deepitelização do tecido gengival.

Watanabe et al.⁸¹ (1987) estudaram a cicatrização de incisões realizadas na mucosa palatina de ratos com o laser de CO₂, potência de 10 W em emissão contínua. A morte dos animais foi induzida em períodos de 1, 3, 5 e 7 dias, e as amostras analisadas na microscopia óptica e eletrônica de transmissão. Imediatamente após a irradiação, observou-se uma cavidade pouco profunda, vazia, cujas bordas mostravam tecido conjuntivo fibroso com sinais de necrose do tipo coagulativo. O epitélio de revestimento nos extremos da cavidade mostrou-se desorganizado e com áreas de necrose. Na porção mais profunda do tecido conjuntivo, o aspecto era normal. Vinte e quatro horas depois, ainda era visível o material amorfo nas bordas da cavidade, e na profundidade, foram observados neutrófilos polimorfonucleares, células redondas, fibroblastos e fibrilas colágenas delicadas. Os vasos sanguíneos do tecido conjuntivo profundo apresentaram-se dilatados e congestos. Três dias após a irradiação, houve proliferação de fibras colágenas. Aos cinco dias, a cavidade mostrou-se preenchida por tecido de granulação e, aos sete dias, o tecido cicatricial achava-se bem organizado.

Em 1989, Kardos et al.³³ avaliaram o efeito do laser de CO₂ sobre a mucosa bucal. Os autores realizaram cortes na língua de ovelhas com o laser CO₂, potência de 4 W, emissão contínua e feixe focalizado. Os animais foram mortos em períodos de uma hora, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias, e as peças analisadas

histologicamente. Segundo os resultados do estudo, imediatamente após a confecção das feridas, houve carbonização das suas bordas, total remoção do epitélio, formação de uma úlcera e, em algumas áreas, remoção de tecido conjuntivo e fibras musculares. A base da úlcera esteve delimitada por uma suave camada de tecido coagulado. Também foram observados vasos sanguíneos superficiais coagulados. Um dia após o procedimento houve reação inflamatória aguda e, aos 4 dias, marcada migração epitelial abaixo do tecido superficial necrosado, porém com manutenção da reação inflamatória. O novo epitélio cobriu totalmente a superfície da ferida aos 14 dias. Células inflamatórias crônicas estiveram presentes ainda aos 28 dias. Os autores concluíram que o laser de CO₂ tem poder de corte e coagulação favorável no tratamento de lesões da mucosa bucal.

Segundo Walsh et al.⁷⁹ (1989) a irradiação pulsada (pulsos de 200 µm) do Er:YAG pode provocar ablação de uma variedade de tecidos (pele, osso, artérias, córnea), ocasionando uma zona de agressão térmica ao redor da área de impacto de 10 µm- 40 µm quando utilizadas fluências menores de 25 J/cm².

Watanabe et al.⁸³ (1989) estudaram as características ultra-estruturais da mucosa lingual irradiada com o laser de CO₂, modelo Sharplan-773. As línguas de cinco ratos foram incisadas longitudinalmente com uma potência de 10 W, emissão contínua. Os animais foram sacrificados imediatamente após a irradiação. Depois da tramitação laboratorial, as peças foram metalizadas e examinadas no microscópio eletrônico de varredura, observando-se a formação de um sulco correspondente à evaporação do tecido epitelial envolvendo as papilas filiformes, fungiformes e a camada epitelial de revestimento. Verificou-se, ao longo

da parede do sulco, a presença de uma camada de material carbonizado e necrótico.

Gomes et al.²⁷ (1990) analisaram comparativamente as alterações provocadas pelo raio laser de CO₂ nas estruturas pancreáticas de cães do ponto de vista da microscopia óptica e eletrônica de varredura. Duas incisões foram efetuadas com o laser de CO₂, 20 W de potência, e uma incisão com o bisturi. A análise microscópica constatou que a aplicação do laser sobre o tecido pancreático produziu uma evaporação tecidual, resultando uma superfície irregular de material necrótico carbonizado com sulcos e forames e, em profundidade, camadas de células rotas com citoplasma coagulado, núcleos picnóticos e ácinos distorcidos entremeados de espaços vazios resultantes da vaporização de células acinares. Os vasos e ductos pancreáticos se apresentaram obliterados por um material amorfo resultante da coagulação do tecido. A espessura da camada alterada pela ação do laser foi em média de 156,40 µm. A secção com o bisturi produziu uma superfície regular com apenas uma camada de ácinos de menor tamanho e algumas células rotas. Os autores concluíram que o laser de CO₂ provocou necrose e uma reação tecidual mais intensa.

Pogrel et al.⁵⁷ (1990) avaliaram o processo de cicatrização de incisões realizadas no abdômen de ratos com o laser de CO₂, criocirurgia e bisturi. O laser CO₂ foi empregado com potências de 5 W, 10W e 20W, diâmetro focal de 1 mm e distância focal de 1 mm. Os animais foram mortos em períodos de 12 horas, 4, 7 e 14 dias, e as peças removidas e preparadas para a análise histológica. No período de 12 horas, houve relativa ausência da resposta inflamatória ao redor das feridas laser e mínima destruição celular a distância da ação do feixe. As feridas

realizadas com o bisturi apresentaram suave extravasamento de hemácias e uma reação inflamatória mais intensa. A criocirurgia provocou, inicialmente, destruição celular com relativa ausência da resposta inflamatória. A epitelização das incisões realizadas com laser e o bisturi deu-se num período de sete dias, porém com permanência de suave exsudato inflamatório. As incisões realizadas com criocirurgia não foram completamente epitelizadas aos sete dias, exibindo ainda um severo exsudato inflamatório crônico. A zona de necrose observada nas feridas laser foi em média de 190 μm , não havendo diferenças significativas entre as potências utilizadas. Os autores concluíram que, nas condições de realização do estudo, o laser de CO_2 removeu tecido de maneira satisfatória, permitindo um reparo rápido, previsível, com mínima resposta inflamatória.

Pogrel et al.⁵⁶ (1990) mediram a extensão de tecido necrosado próximo a áreas irradiadas com o laser de CO_2 , em diferentes tipos de tecido mole da cavidade bucal em humanos. Foram removidas 23 biopsias de tecido variado: mucosa bucal, tecido conjuntivo frouxo e denso, músculo e mucosa das glândulas salivares. O aparelho utilizado foi CO_2 Xanar Articulator, com uma potência de 17,5 W, focalizado a 1 mm de distância do tecido. Todos os tecidos analisados tiveram carbonização, coloração intensa eosinofílica e coagulação das proteínas teciduais na área irradiada. A maior extensão de necrose foi observada no tecido conjuntivo denso, na mucosa bucal e no músculo. No tecido conjuntivo denso e frouxo, houve superfície carbonizada, necrose, perda das fibras colágenas, perda da morfologia celular, vasos sanguíneos ocluídos e alguns vacúolos, resultado da expansão do vapor da água. Na zona mais profunda, 100 μm a 150 μm da superfície, foi observado tecido conjuntivo normal. Os autores concluíram que a extensão da

agressão térmica provocada pela irradiação difere nos diferentes tipos de tecidos. Utilizando os mesmos parâmetros de irradiação, essas diferenças podem ser o resultado de uma combinação de fatores como a densidade do tecido, seu conteúdo de água e a condutividade térmica.

Num estudo experimental, Watanabe et al.⁸² (1990) avaliaram os efeitos do laser de CO₂ na mucosa dorsal da língua de ratos. A irradiação contínua de 10 W de potência foi feita na mucosa da região anterior da língua dos animais. A morte foi induzida em períodos de 5, 7, 15 e 21 dias. As amostras foram examinadas no microscópio eletrônico de varredura. O período de 5 dias evidenciou a presença de material necrótico com pequenos grânulos e estruturas não definidas. A superfície da lesão mostrou células irregularmente dispostas, tanto normais quanto descamadas. A partir dos 7 dias, houve tecido neoformado preenchendo toda a ferida. Na superfície do tecido em reparação, observaram-se elevações de estruturas semelhantes a papilas neoformadas.

Zweig et al.⁸⁶ (1990) avaliaram a agressão ocasionada aos tecidos adjacentes a áreas irradiadas. Foram realizadas incisões no epitélio do dorso de ratos com a emissão pulsada dos lasers CO₂ Coherent Everlase150, comprimento de onda de 10,6 µm, e Er³⁺ JK 2000, comprimento de onda de 2,94 µm, com energias por pulso de 100 mJ, frequência 4 Hz e pulsos de 250 µs para ambos os lasers. Os animais foram mortos imediatamente após o experimento, e as peças preparadas para análise histológica. Perto das incisões foram distinguidas duas zonas termicamente alteradas: uma zona interna de coagulação e uma zona externa, que os autores chamaram de transição. Na área de coagulação, as fibras colágenas mostraram-se parcialmente estouradas e perderam sua periodicidade

estrutural. Na zona de transição, as fibras colágenas estouradas e intactas achavam-se misturadas e a periodicidade das fibras parcialmente reconhecida. A extensão das duas zonas foi duas vezes maior nas incisões realizadas com o laser de CO₂ do que nas incisões realizadas com o laser Er³⁺. A zona de coagulação, no caso do CO₂, foi de 102 µm ± 16 µm; entretanto, com Er³⁺ foi de 42 ± 3 µm. A zona de transição provocada pelo laser de CO₂ foi de 375 µm ± 52 µm e a provocada pelo ER³⁺ foi de 198 µm ± 70 µm. Houve um incremento de temperatura de 77° ± 4°C na zona de coagulação e de 61° ± 4°C na zona de transição para ambos os lasers. Os autores acreditam que a agressão térmica produzida aos tecidos adjacentes à área irradiada é resultado da condução do calor.

Em 1992, Lanzafame & Hinshaw³⁷ referiam-se ao ceticismo de muitos cirurgiões acerca do uso da tecnologia laser. Entre os fatores que influenciam a decisão de não utilizar o laser, os autores citam a diferença na sensação tátil, a falta de desenhos ergonômicos para muitos dos lasers cirúrgicos e dúvidas na seleção da dosagem correta para a realização de incisões com a profundidade requerida pelo caso e que provoque uma hemóstase efetiva sem causar excessivo dano térmico. Segundo esses autores, deve-se realizar esforços para incrementar a utilização dessa tecnologia nas instituições de ensino, elevando, dessa forma, seu nível de aceitação como instrumento de uso diário.

Mausberg et al.⁴³ (1992) compararam os achados histológicos sobre incisões realizadas com bisturi elétrico e o laser de CO₂ e de Nd:YAG na mucosa bucal de porcos. O laser CO₂ (Zeiss Opmilas) foi empregado com potências entre 2 w e 20 W em emissão contínua. A irradiação com o laser Nd:YAG (MBB Medilas) deu-se com potências entre 10w e 100W, emissão contínua. Também foi utilizada

uma unidade eletrocirúrgica, com uma ponta cirúrgica de 3 mm de diâmetro. As incisões foram realizadas no palato de porcos recém-sacrificados. Logo após as irradiações, os fragmentos de tecido foram preparados para a análise histológica. A profundidade das incisões realizadas com o laser de CO₂ e a extensão da área de coagulação estiveram relacionadas com a potência empregada. No epitélio, a incisão esteve bordeada por remanescentes tissulares fundidos. Na lâmina própria, a incisão foi nitidamente limitada por tecido carbonizado. As fibras colágenas e os fibroцитos foram fundidos formando uma massa basófila homogênea. O laser de Nd:YAG não teve poder de corte, somente produziu sulcos superficiais e coagulação. Os achados histológicos sobre as incisões feitas com o bisturi elétrico foram similares aos do laser CO₂, porém com menos agressão do estrato basal.

Rossmann et al.⁶⁴ (1992) estudaram a deepitelização controlada, utilizando o laser de CO₂, com a finalidade de retrasar a migração epitelial no tratamento cirúrgico de defeitos ósseos induzidos no maxilar de macacos. Retalhos mucoperiosteais foram levantados e, no grupo experimental, o epitélio foi eliminado com o laser de CO₂, com 10 W de potência. A camada de tecido carbonizado foi removida com uma gaze úmida e, o retalho, reposicionado. No grupo controle, o epitélio foi eliminado com bisturi. Os animais foram mortos em períodos de 7, 14 e 28 dias. A análise histológica do grupo experimental, no período de três dias, mostrou necrose superficial, ausência de epitélio, coagulação, reação inflamatória de leve a moderada, e atividade fibroblástica. A inflamação se manteve até os 28 dias, observando-se por primeira vez nesse período, crescimento epitelial. No grupo controle, a inflamação foi leve, houve atividade fibroblástica aos sete dias, e epitélio

queratenizado aos 14 dias. Os autores concluíram que o laser de CO₂ pode retrasar o crescimento epitelial, melhorando a aderência de tecido conjuntivo novo ao osso.

Miller & Truhe⁴⁵ (1993) citam como vantagens do uso do laser nas cirurgias a rapidez da cicatrização, rápida hemostasia, campo operatório relativamente seco melhorando a visibilidade durante o procedimento, esterilização da área cirúrgica pela vaporização de microrganismos, maior rapidez em alguns procedimentos, diminuição do trauma ao tecido adjacente, redução da dor e inflamação pós-cirúrgica, redução da formação de cicatriz, e a aceitação dessa modalidade de tratamento por parte dos pacientes.

Garcia & Milanezi²⁴ (1995) avaliaram, desde o ponto de vista biométrico, o reparo de feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos e submetidas ao tratamento com raio laser. A cada lado do plano sagital médio do dorso do rato, foi confeccionada uma ferida com um *punch* de 8 mm de diâmetro, sendo uma delas irradiada e a outra não. As feridas experimentais foram irradiadas com o laser Cavity-D1-U, comprimento de onda de 904 nm, emissão pulsada, com uma densidade de energia de 3 J/cm². A aplicação do laser foi feita de forma pontual em oito localizações distintas na área mais externa da ferida e em forma de varredura na zona central. A análise biométrica consistiu em medições do diâmetro interno das feridas imediatamente após os procedimentos e em intervalos de 3, 7 e 14 dias utilizando um paquímetro. Os resultados do estudo indicaram que as feridas tratadas com laser tiveram maior contração tecidual.

Evrard et al.¹⁸ (1996) realizaram feridas cirúrgicas com o laser de CO₂ na língua de ratos, com a finalidade de avaliar o processo de reparo. O aparelho utilizado foi o Laserat CO₂, com uma potência de 5 W, emissão contínua,

tempo de irradiação de 5 segundos. As incisões foram realizadas na região anterior da superfície dorsal da língua. Os animais foram mortos imediatamente, 2, 4, 6, 8, 10 e 30 dias após a irradiação. A análise histológica mostrou vaporização instantânea do fluido intra e extracelular, desintegração das células, desnaturação das proteínas extra celulares e oclusão dos capilares. A profundidade das feridas esteve entre 0,4 mm e 0,8 mm. No segundo dia, a superfície da incisão esteve lisa, desprovida de restos necróticos, coberta por fibrina, e tendo sido observada a presença de células polimorfonucleares. No quarto dia, houve tecido de granulação com capilares orientados perpendicularmente à superfície da ferida, numerosos polimorfonucleares, células mesenquimais e miofibroblastos. No décimo dia, houve completa reepitelização das feridas.

Garcia et al.²⁵ (1996) estudaram o processo de reparo de feridas cutâneas provocadas com um *punch* cirúrgico de 8 mm de diâmetro no dorso de ratos e submetidas ao tratamento com raio laser. Foram removidos dois fragmentos da pele, um de cada lado do plano sagital mediano, considerando-se uma ferida como experimental (irradiada) e outra como controle (sem irradiação). As aplicações foram realizadas com o laser Cavity-D1-UP, semiconductor arsênio e gálio, comprimento de onda de 904 nm, emissão pulsada, 2.000 mW de potência, 2.100 Hz de frequência, densidade de energia de 3 J/cm², 108 segundos de irradiação em forma de varredura. A morte dos animais foi induzida em períodos de 3, 7 e 14 dias, as peças foram removidas e submetidas a tramitação laboratorial de rotina. Na análise comparativa dos eventos biológicos, as feridas do grupo experimental mostraram um reparo mais evoluído do que o grupo controle. O laser promoveu uma grande migração epitelial e acentuada proliferação fibroblástica e vascular.

Rizoiu et al.⁵⁹ (1996) compararam o processo de reparo de feridas realizadas com o laser de ErCr:YSGG, o bisturi e um *punch* para biopsia. As feridas foram realizadas na mucosa da face ventral da língua, na pele do dorso e da orelha de ratos. As feridas feitas com bisturi tiveram uma profundidade de 2,5 mm. As com *punch* tiveram um diâmetro de 3 mm. O sistema laser utilizado foi o ErCr:YSGG Biolase, comprimento de onda de 2,78 μm , com sistema de refrigeração acoplado. Os parâmetros de irradiação utilizados foram: potência de 2 W, frequência de 20 Hz, largura do pulso de 140 μs e tempo de 2 segundos. A análise histológica mostrou que as feridas realizadas com *punch*, bisturi ou laser apresentaram características semelhantes. No período de 8 horas, foi observada a perda da superfície epitelial substituída por fibrina, presença de hemácias e neutrófilos polimorfonucleares. Já no período de 24 horas, houve epitélio neoformado nas bordas das feridas, brotamentos capilares, neutrófilos e células mononucleares. A superfície das feridas esteve completamente reepitelizada aos sete dias. As margens das feridas realizadas com laser exibiram uma área de coagulação de 20 μm a 40 μm de extensão, área que representa o efeito termocoagulador do laser. Esses achados indicam que o laser de ErCr:YSGG, quando utilizado com sistema de refrigeração (spray ar-água), produz menos efeitos térmicos do que outros lasers e estimula uma reação tecidual comparável à ocasionada por instrumentos cirúrgicos convencionais.

Speyer et al.⁷¹ (1996) realizaram incisões na mucosa bucal de cães para avaliação do processo de reparo. As incisões foram realizadas com o laser de CO_2 , emissão com pulsos de 0,1 segundos e potência de 5 W. As incisões tiveram

um comprimento de 2,5 cm e uma profundidade de 1mm. A morte dos animais foi induzida imediatamente após as irradiações e em períodos de 3, 7 e 14 dias. Na análise microscópica das amostras, foi observada uma agressão térmica consistente na desnaturação do colágeno, formação de um coágulo de fibrina e a presença de células inflamatórias no período de três dias, para dar passo ao processo de reparo caracterizado pela formação de um tecido de granulação bem organizado, pela angiogênese e completa epitelização em 14 dias.

Watanabe et al.⁸⁰ (1996) realizaram cirurgias de tecido mole na cavidade bucal empregando o laser de Er:YAG. Os pacientes clinicamente diagnosticados apresentavam periodontite, gengivite, hiperplasias gengivais, estomatite aftosa, freios anormais, e deposição de cálculo. O sistema utilizado foi o Er:YAG ML-22, comprimento de onda de 2,94 μm . Os tecidos foram irradiados com uma energia de 80 mJ e uma taxa de repetição de 10 Hz. Durante as cirurgias, a hemostasia não foi completa, porém o sangramento foi consideravelmente menor do que o provocado pelos instrumentos cirúrgicos convencionais. A camada de tecido carbonizado comumente observada depois da irradiação com os lasers de CO₂ e Nd:YAG esteve ausente e houve epitelização numa semana. Os autores concluíram que o laser de Er:YAG é clinicamente seguro quando utilizado em cirurgias de tecido mole.

Na análise histológica de tecido gengival irradiado com o laser de CO₂, Centty et al.⁷ (1997) observaram a total carbonização do epitélio e áreas de necrose por coagulação. O tecido conjuntivo subjacente exibiu três zonas: a zona de necrose tissular com colágeno coagulado e quase nenhuma célula presente; a zona de efeito térmico exibindo pequenas artérias, arteríolas e veias obliteradas por

coágulos assim como inflamação moderada e fibras colágenas com aparência vidrosa, e a zona de tecido conjuntivo normal. Os autores concluíram que o laser de CO₂ pode eliminar o epitélio, deixando o tecido conjuntivo basicamente inalterado.

Hohenleutner et al.²⁸ (1997) realizaram a ablação in vivo e in vitro, de pele humana com o laser de Er:YAG MCL29, empregando energias por pulso entre 200 mJ-500 mJ, frequências de 7 Hz e 10 Hz, pulsos de 250 µs. Segundo os resultados, a densidade mínima de energia necessária para a ablação do tecido foi de 1,6 J/cm². Os autores determinaram uma média de ablação por pulso de 2,5 µm para cada J/cm². Fluências, em media, de 4 J/cm² aplicadas em movimentos de varredura “sweeping motion” provaram ser ótimas para uma ablação eficiente, deixando a superfície suave e uma zona de agressão térmica não maior do que 50 µm.

Kautzky et al.³⁴ (1997) examinaram, pelas microscopia de luz e eletrônica de transmissão, os efeitos biológicos do laser pulsado de Ho:YAG, comprimento de onda de 2,12 µm, na mucosa bucal de ratos. As incisões foram realizadas na superfície ventral da língua, alcançando a camada muscular, empregando uma energia de 400 mJ, frequência de 2 Hz e largura do pulso de 2,5 µs. Os animais foram mortos imediatamente depois das cirurgias, e as línguas removidas para análise histológica. Na análise microscópica, não foi observada zona de carbonização na superfície epitelial, e a área de necrose por coagulação foi de 370 µm - 640 µm. O defeito em forma de V alcançou a camada muscular. Os vasos sanguíneos sofreram alterações no endotélio e na sua luz. Segundo os autores, o incremento de temperatura observado neste estudo foi da temperatura inicial de 32°C até os 58°C, mensurada diretamente na língua a uma distância de

800 μm da área alvo. Este resultado é concordante com a análise micromorfológica da lesão onde não foi observada carbonização.

Lanzafame & Naim³⁸ (1997) realizaram um estudo preliminar para avaliar o protótipo do laser Ytrium Aluminium Garnet (YAG), comprimento de onda de 1,44 μm . Foram realizadas incisões na pele, no músculo e no fígado de ratos empregando energias entre 0,5 J e 1,25 J, e frequências de 25 Hz, 35 Hz e 40 Hz. A morte dos animais foi induzida imediatamente, 11 e 21 dias depois da irradiação. As peças sofreram tramitação laboratorial e foram analisadas no microscópio. Uma área de coagulação foi observada imediatamente após todas as incisões (pele, músculo, fígado). Não houve evidências de infecção, e o reparo da área incisa deu-se sem a formação de cicatriz. Também foi observada uma reação inflamatória crônica dentro de limites aceitáveis. Segundo os autores, o comprimento de onda de 1,44 μm interatua com o tecido de forma semelhante ao laser de Ho:YAG (2,1 μm) devido à grande absorção pela água nesses comprimentos de onda.

Fortune et al.²³ (1998) avaliaram o processo de reparo de incisões realizadas na mucosa bucal de cães utilizando o laser de CO₂ TruPulse, com uma energia de 200 mJ, frequência de 5 Hz, e pulsos de 60 μs , 100 μs , 120 μs . As incisões tiveram um comprimento de 2,5 cm e 1 mm de profundidade. A morte dos animais foi induzida imediatamente e em períodos de 3, 7 e 14 dias. A análise microscópica de todas as feridas revelou a formação de uma cratera rodeada de colágeno desnaturado e a coagulação típica das lesões térmicas induzidas pelo laser. Aos 3 dias, foi observada migração epitelial, uma camada superficial de colágeno desnaturado e neovascularização. Aos 7 dias, houve tecido de granulação com elevada quantidade de fibroblastos e células inflamatórias, migração epitelial e

a camada de colágeno desnaturado parcialmente fagocitada. Aos 14 dias, a migração epitelial foi completa. Pulsos de 60 μm produziram áreas de agressão térmica menores do que os pulsos de 100 μm e 120 μm .

Garcia & Theodoro²⁶ (1998) utilizaram o laser de CO_2 no tratamento cirúrgico da hiperplasia gengival inflamatória. As observações clínicas pós-operatórias mostraram o laser de CO_2 efetivo na remoção da hiperplasia gengival. A técnica cirúrgica foi aplicada num procedimento rápido, com mínimo de sangramento e desconforto para o paciente, sem efeitos indesejáveis tanto no tecido gengival quanto no dentário. Segundo os autores, os efeitos do laser de CO_2 em tecidos compostos por 70% a 90% de água atingem uma profundidade de 0,17 mm.

Romanos et al.⁶² (1999) avaliaram a cicatrização de incisões realizadas no palato de macacos, utilizando um bisturi cirúrgico e o laser de CO_2 . Para as irradiações, foram utilizadas potências de 2 W, 4 W e 6 W em emissão contínua, focalizada a 0,5 cm de distância do tecido e tempo de irradiação de 6 segundos. Segundo os achados histológicos, as incisões realizadas com laser mostraram necrose do tecido e uma marcada reação inflamatória diretamente relacionada com o aumento da potência utilizada. Aos 3 dias, a superfície epitelial foi substituída por um exsudato fibrinopurulento. No tecido conjuntivo, houve fragmentação e desorientação das fibras colágenas, infiltrado de células inflamatórias presentes tanto na inflamação aguda como na crônica. Aos 7 dias, a ferida apresentava-se completamente epitelizada, e no tecido conjuntivo houve pequenas quantidades de fibrilas colágenas novas entre as fibras já existentes e um suave infiltrado de células inflamatórias mononucleares. As feridas realizadas com o

bisturi foram completamente epitelizadas no período de 3 dias, com evidências de atividade fibroblástica e um suave infiltrado de células mononucleares. Aos 14 dias houve completa regeneração do epitélio e do tecido conjuntivo nos dois tipos de incisões. Segundo os resultados do estudo, o laser de CO₂ ocasionou maiores mudanças no tecido e uma intensa reação inflamatória retardando o reparo no estágio inicial.

Patroncio⁵⁰ (2000) estudou a qualidade do reparo da mucosa bucal de ratos submetida à radiação do laser de dióxido de carbono (CO₂) com a finalidade de estabelecer parâmetros que permitam cirurgias com um mínimo de dano tecidual. As irradiações foram realizadas na mucosa da região jugal direita com potências de 2 W, 7 W e 10 W, emissão pulsada, pulsos de 0,5 segundos. A morte dos animais foi induzida imediatamente, 3 e 7 dias após a cirurgia. Segundo os resultados do estudo, os animais irradiados com 2W de potência não apresentaram atraso significativo na cronologia de reparo, mostrando-se esta potência adequada para uso em mucosa. Os animais irradiados com 7 W e 10 W apresentaram comprometimento e atraso na cronologia de reparo, quando comparados aos do grupo de 2 W. O autor salientou que o uso dessa técnica exige a realização de novos experimentos com a finalidade de estabelecer protocolos cirúrgicos para diferentes aplicações nos tecidos bucais.

Segundo Strauss⁷² (2000), os lasers de CO₂ e de Er:YAG são primeiramente absorvidos pela água. Nos tecidos, essa absorção dar-se-ia de maneira superficial (0,1 mm de profundidade) causando, a 100°C, vaporização do fluido extra-celular, ruptura celular e perda de 75% a 95% do volume celular. A temperaturas maiores, a matriz orgânica é também vaporizada, resultando em total

ablação do tecido. Entretanto, o calor gerado na irradiação estende-se lateralmente por condução térmica, provocando uma série de círculos concêntricos ao redor do alvo, onde os efeitos térmicos diminuem desde o centro até a periferia. A zona de agressão térmica colateral pode estender-se 500 µm do alvo com o laser de CO₂ e é consideravelmente menor com o Er:YAG.

No ano de 2002, Ayhan et al.⁴ utilizaram o laser de Er:YAG para ablação da cartilagem de orelha de ratos, ocasionando áreas de necrose superficial e degeneração da cartilagem. A proliferação de nova cartilagem, sem evidências de fibrose no tecido conjuntivo foi observado aos 10 dias. Segundo os autores, o laser de Er:YAG tem a possibilidade de provocar ablação com controle da quantidade de tecido removido.

Fonoff²² (2002) avaliou o processo de reparo tecidual do fênuo labial inferior de ratos após realização de frenectomia com o laser de CO₂, seguida ou não da aplicação do laser As-Ga-Al. O laser de CO₂ foi utilizado com uma potência de 4W, em irradiação contínua. Na análise microscópica, foi observada a vaporização da camada epitelial e de tecido conjuntivo subjacente, formando uma cratera ampla com superfície carbonizada sem sangramento. Na reparação tecidual, conforme observações efetuadas ao longo dos sucessivos períodos de tempo, ocorreu proliferação de fibroblastos, presença de numerosas células polimorfonucleares, neoformação de capilares sanguíneos e proliferação do epitélio desde as bordas da ferida até o centro. As feridas que receberam aplicação do laser de baixa intensidade tiveram um reparo ligeiramente mais avançado.

Sinha & Gallagher⁶⁹ (2003) compararam o laser de CO₂ com vários instrumentos cirúrgicos na realização de incisões na mucosa bucal de porcos.

Feridas realizadas com o bisturi convencional, bisturi ultra-sônico, bisturi elétrico e o laser de CO₂ foram analisadas histologicamente, notando-se nas feridas confeccionadas pelo laser uma zona de tecido coagulado, necrose, inflamação aguda com presença de neutrófilos nas primeiras duas semanas de avaliação, e aos 28 dias linfócitos e macrófagos, com áreas de necrose tecidual e atraso na epitelização. Os demais instrumentos promoveram completa epitelização e resolução da inflamação aos 7 dias.

Proposição

3. Proposição

Analisar histologicamente a reação do tecido conjuntivo do dorso de ratos irradiado com o laser de CO₂ ou de Er: YAG.

Material e Método

4.1 Material e Método

4.1.1 Preparo dos animais e confecção das feridas

Para a realização do presente estudo, foram utilizados 30 ratos (*Ratus Novergicus*, *Albinus*, Holtzman) machos, pesando em média 150 gramas. Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de anestésico Ketamina (Francotar® -10 ml- uso veterinário. Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.), na dosagem de 0,08 ml por 100 gramas de peso corpóreo, associado ao relaxante muscular e analgésico Cloridrato de Xylazina (Virbaxyl® 2%- 10 ml- uso veterinário. Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.), na dosagem de 0,04 ml por 100 gramas de peso corpóreo. Para a administração da anestesia, foi utilizada uma seringa de insulina (1 ml), sendo o local da anestesia a musculatura interna da coxa do rato (Figura 1).

Inicialmente, procedeu-se à depilação da pele do dorso do animal (aparelho Wahl Chrome Pro Adjustable), seguida pela anti-sepsia da área depilada com detergente de mamona (Endoquil 0,1%). A depilação complementar deu-se com um aparelho de barba manual acoplado com lâmina de aço (Wilkinson Sword, Gillette do Brasil).

No dorso de todos os animais, foram confeccionadas duas feridas, de forma circular, com um *punch* para biopsia de 3 mm de diâmetro (Biopsy Punch, Laboratórios Stiefel LTDA, Brasil) para remoção do epitélio e exposição do tecido conjuntivo. Os animais foram divididos em 3 grupos de 10 animais, resultando em 20 feridas por cada grupo experimental (Figuras 2 e 3).

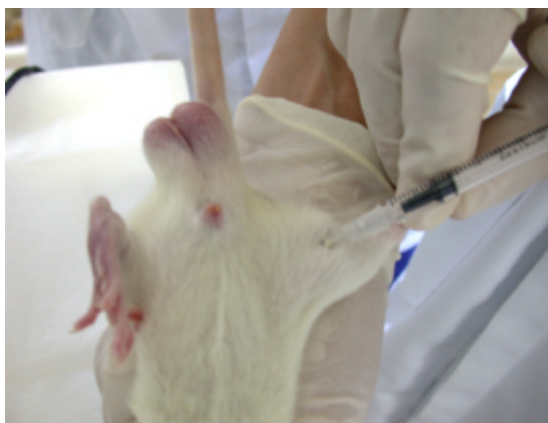


FIGURA 1- Anestesia intramuscular na parte interna da coxa do rato.

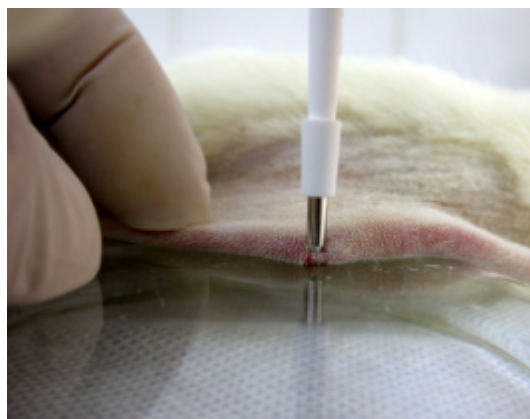


FIGURA 2- Confeção da ferida com *punch* no dorso do rato.



FIGURA 3- Feridas confeccionadas no dorso do rato expondo o tecido conjuntivo.

4.1.2 Irradiação laser

Grupo I: as feridas receberam a irradiação do laser de CO₂ SL-225 (Medical Energy, INC. Florida, USA) para remover o tecido conjuntivo superficial, utilizando os seguintes parâmetros: potência de 1.5 W, frequência de 50 Hz, emissão chaveada, distância focal de 1 cm, tempo de irradiação de 23 segundos, movimento de varredura (Figuras 4 e 6).

Grupo II: as feridas foram irradiadas com o laser de Er:YAG Dental Twinlight (Fotona Medical Laser, Ljubljana, Slovenia) para remover o tecido conjuntivo superficial utilizando os seguintes parâmetros: energia por pulso de 300 mJ (3 W), frequência de 10 Hz, emissão pulsada, distância focal de 1,5 cm, tempo de irradiação de 23 segundos, movimento de varredura (Figuras 5 e 6).

Grupo III ou controle: as feridas não foram submetidas à irradiação.

Durante as irradiações foram obedecidas as normas de segurança estabelecidas para o uso dos lasers cirúrgicos, referentes ao cuidado do paciente, pessoal de trabalho, uso do equipamento e local de uso do laser.



FIGURA 4- Irradiação com o laser de CO₂.



FIGURA 5- Irradiação com o laser de Er:YAG

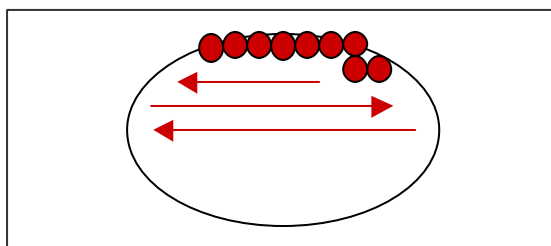


FIGURA 6- Movimento de varredura

4.1.3 Proteção das feridas

Após a irradiação, as feridas dos três grupos foram protegidas com o cimento Agregado Trióxido Mineral (Angelus[®], Brasil) (Figura 7). O MTA foi manipulado segundo as indicações do fabricante, incorporando uma medida de pó a uma gota de água destilada sobre uma placa de vidro estéril, espatulado durante 30 segundos com uma espátula de metal até uma perfeita homogeneização dos componentes. A mistura foi colocada sobre a ferida com auxílio de um instrumento de inclusão e pressionada suavemente para a melhor adaptação do material. Em cima do MTA foi colocado um apósito (Band-Aid, Johnson & Johnson, LTDA Brasil), para evitar o deslocamento do material antes de completado o período de endurecimento (Figuras 8, 9 e 10).

4.1.4 Cuidado com os animais

Durante todo o decorrer do experimento, os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP e alimentados com uma ração balanceada e água “ad libitum” até completar os períodos experimentais. O estado geral dos animais foi avaliado diariamente.



FIGURA 7- Apresentação do MTA Angelus.

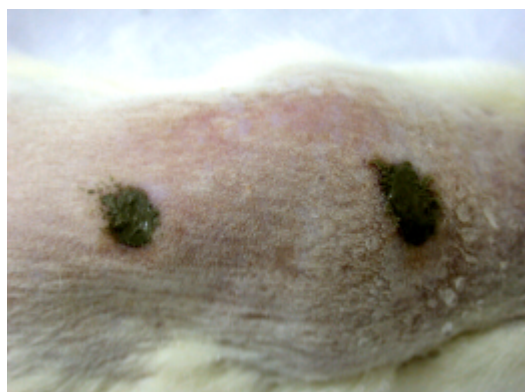


FIGURA 8- Feridas protegidas com MTA.

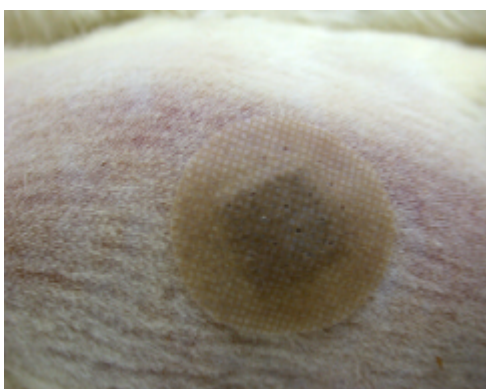


FIGURA 9 –Colocação do apósito sobre o MTA

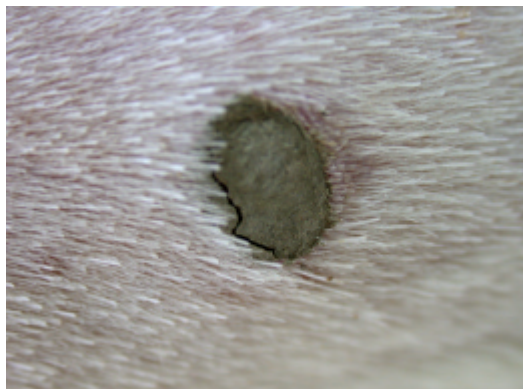


FIGURA 10- Manutenção do cimento aos 7 dias.

4.1.5 Obtenção, processamento e análise das amostras

A morte dos animais foi induzida em períodos de um e sete dias por sobredose do anestésico Hidrato de Cloral a 10%, injetado via intraperitoneal. Em seguida, foram removidos, em separado, os fragmentos teciduais correspondentes às feridas, devidamente identificados e imediatamente imersos na solução fixadora (solução de formol de Lillie tamponado, pH 7,4) por um período de 72 horas em

temperatura ambiente. Após esse período, as peças foram lavadas com água corrente por 24 horas e submetidas à tramitação laboratorial de rotina, sendo desidratadas em álcoois de concentração crescente (álcool 70%, álcool 80%, álcool 90%, álcool absoluto), diafanizadas com álcool-xilol e incluídas em parafina para a confecção dos blocos e posterior realização de cortes seriados longitudinais de 6 μ de espessura por meio de um micrótomo rotatório (HM 325- Microm). Os cortes foram corados pela hematoxilina / eosina, para ter uma visão geral da morfologia celular.

A análise histológica do tecido foi realizada em microscópio óptico comum Zeiss (Modelo Jenaval), e os eventos histológicos ocorridos em cada um dos grupos avaliados foram devidamente descritos e documentados por meio de fotomicrografias. As reações foram analisadas segundo o grau de inflamação determinado 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 e submetido à análise estatística.

A reação do tecido foi classificada em escores obtidos segundo a ISO 7405:1997³⁰, com algumas modificações realizadas neste trabalho (Tabela 1).

TABELA 1: Escores determinados para quantificar os respectivos fenômenos histológicos observados.

Escore	Observação
0	Ausência de inflamação
1	Inflamação leve
2	Inflamação moderada
3	Inflamação severa
4	Presença de tecido necrótico

A caracterização de cada escore foi baseada nos seguintes aspectos:

- 0) nenhuma inflamação: tecido com características de normalidade;
- 1) inflamação leve: presença de células inflamatórias polimorfonucleares difusas, macrófagos e as características do tecido ainda identificáveis;
- 2) inflamação moderada: acúmulos focais de células inflamatórias polimorfonucleares, macrófagos, desagregação do tecido sem necrose tecidual;
- 3) inflamação severa: substituição do tecido conjuntivo por um intenso infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares;
- 4) presença de tecido necrótico: coleção localizada de células em processo de degeneração.

4.2 Planejamento estatístico

Neste trabalho, pretendeu-se avaliar histologicamente a reação do tecido conjuntivo irradiado com os lasers de CO₂ (Grupo I) ou de Er: YAG (Grupo II) e não irradiado (Grupo III: controle). A reação foi medida em escores de 0 a 4 de acordo com o grau de inflamação do tecido conjuntivo e realizada em dois períodos: 1 dia e 7 dias após a irradiação. Esses seis conjuntos de medições, realizadas em grupos distintos de ratos, foram designadas por GI(1), GI(7), GII(1), GII(7), GIII(1) e GIII(7), conforme o grupo experimental e o período de avaliação.

Para a análise dos resultados, foram empregados métodos estatísticos não-paramétricos, pelos quais foram comparados os postos médios dos escores atribuídos à reação do tecido conjuntivo. A análise estatística foi dividida em três partes, de acordo com as comparações de interesse:

- a) comparação, pelo teste de Mann-Whitney, entre os escores da reação do tecido conjuntivo dos dois períodos de avaliação, para cada grupo separadamente;
- b) comparação, pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas pelo teste de Dunn, dos escores dos três grupos experimentais no primeiro período de avaliação (um dia);
- c) comparação, pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas pelo teste de Dunn, dos escores dos três grupos experimentais no segundo período de avaliação (sete dias).

Todos os testes foram realizados ao nível de 5% de significância. Isto quer dizer que quando se concluiu haver diferença significativa entre os grupos em comparação, a probabilidade de erro nesta afirmativa foi de 0,05 ou menor.

Procurou-se indicar, também, se em um nível de significância menor, como 1%, ainda poderia ser afirmado que a diferença entre os grupos era significativa.

Resultado

5.1 Resultados da análise histológica

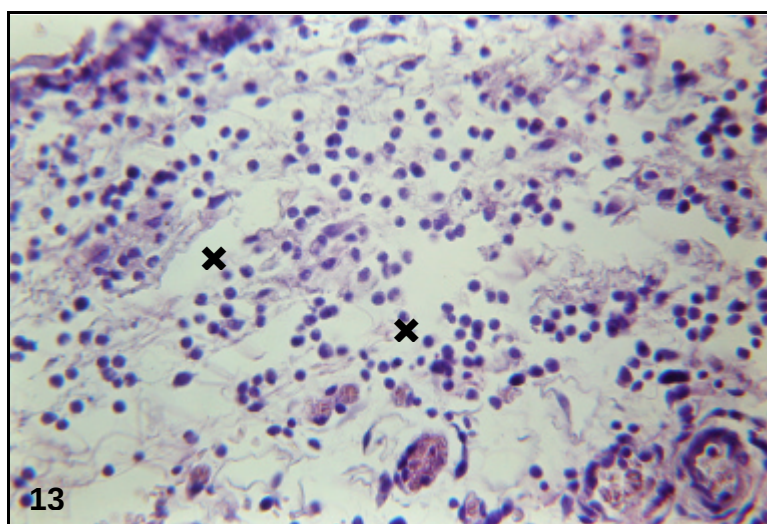
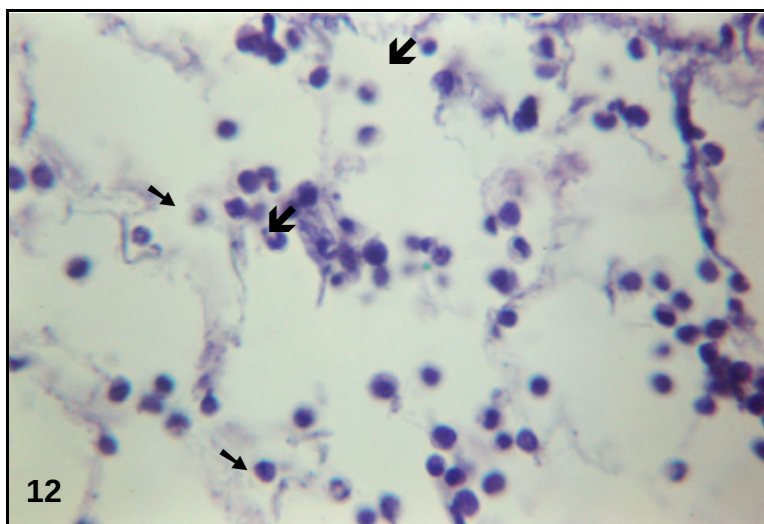
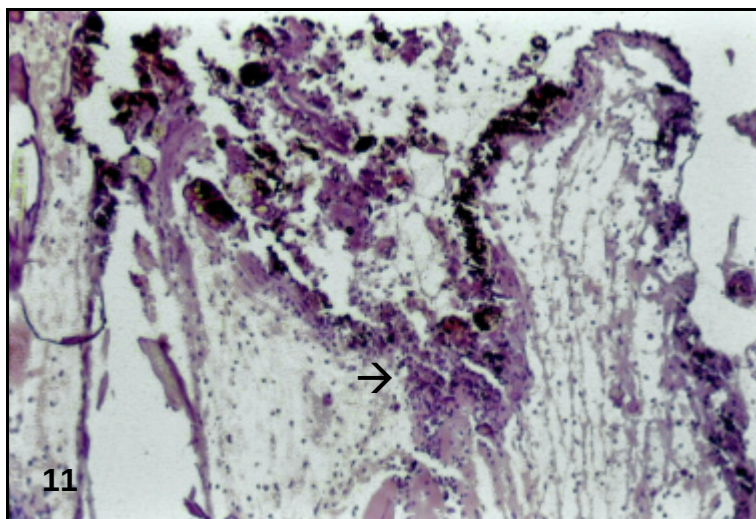
Grupo I - laser de CO₂

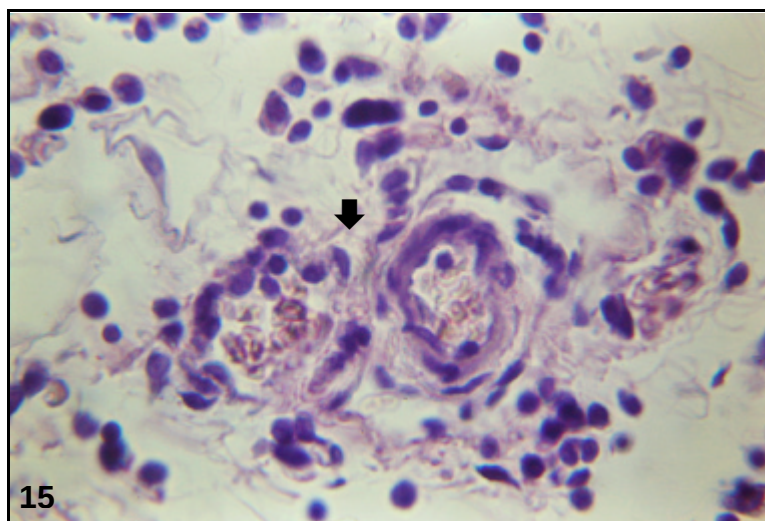
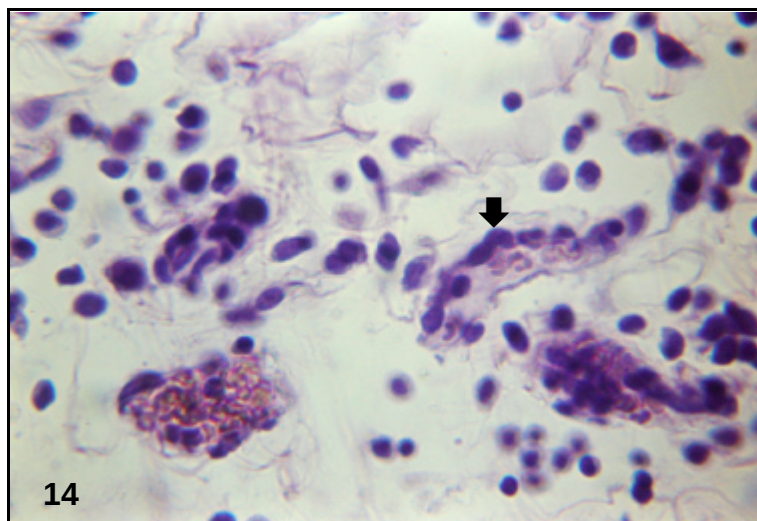
Período experimental de um dia

No período de um dia, a visão geral da lesão apresentou um espesso tecido necrótico e células do tecido conjuntivo em processo de degeneração (Figura 11).

O tecido conjuntivo exposto à irradiação encontrou-se rarefeito, com grandes vacúolos intercelulares preenchidos por líquido tissular. Esses vacúolos estavam delimitados por fina trama de fibrina formando filamentos muito finos. Houve presença de grande número de leucócitos, tanto do tipo polimorfonucleares como mononucleares. Em meio aos leucócitos ocorreram, também, muito macrófagos ativos. O tecido conjuntivo encontrou-se com quase total ausência de fibroblastos (Figuras 12 e 13).

Nesse período, os vasos sanguíneos encontraram-se em número reduzido e, quando presentes, estavam hiperemiados. Houve marginação leucocitária e diapedese acentuada reveladas pela grande concentração de leucócitos rodeando os vasos sanguíneos (Figuras 14 e 15).



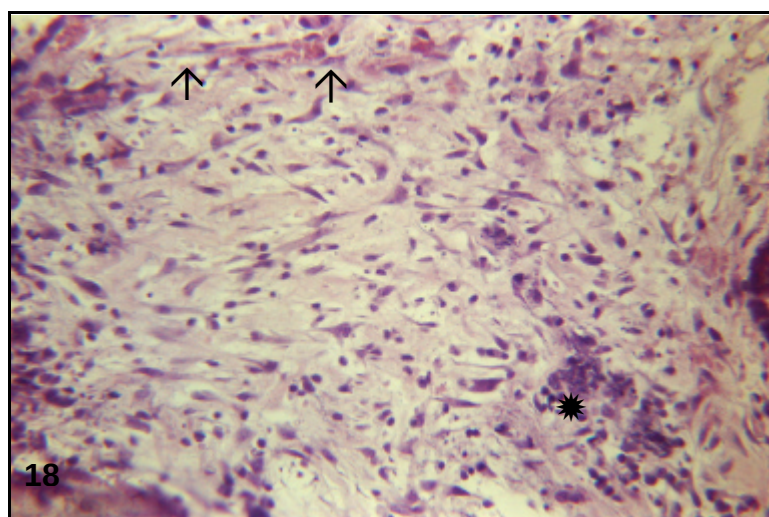
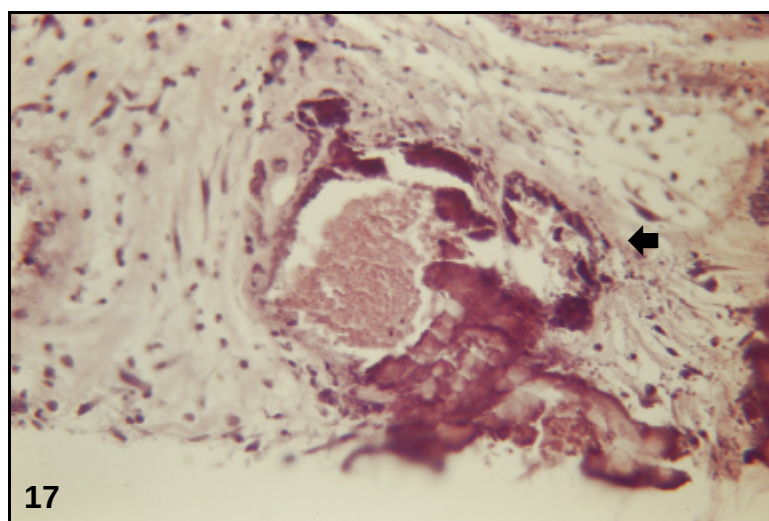
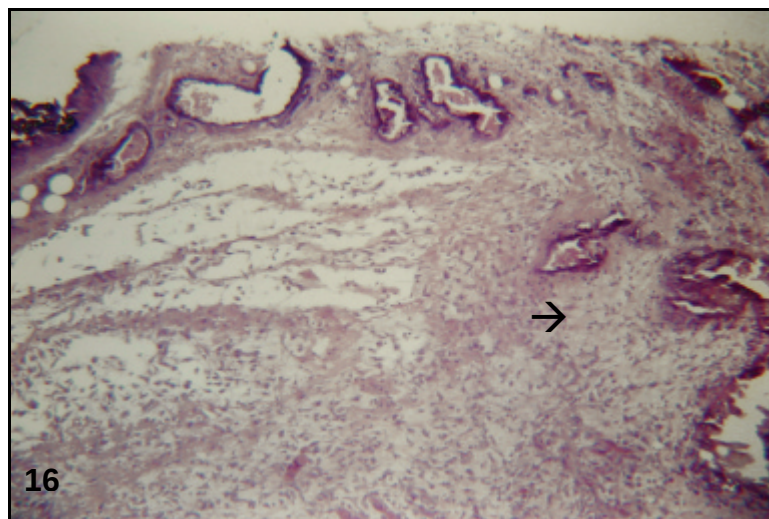


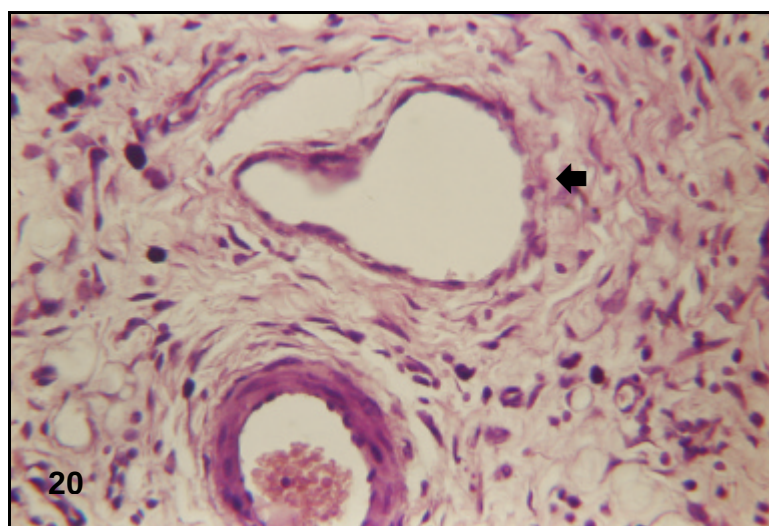
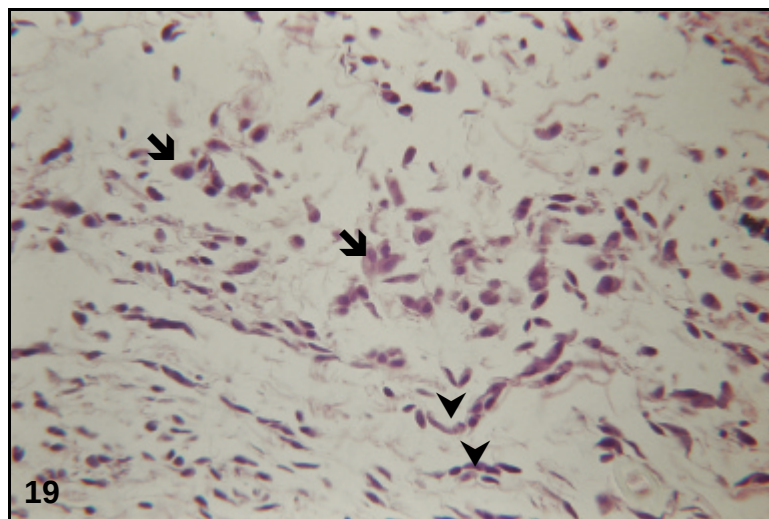
Laser de CO₂ - período experimental de sete dias

Aos 7 dias, a visão geral do tecido lesado mostrou necrose superficial das células epiteliais situadas na periferia. O tecido conjuntivo esteve rarefeito, com presença de poucos vasos sanguíneos (Figura 16).

As paredes dos vasos sanguíneos compostas pelas três túnicas, íntima, média e adventícia, encontraram-se queimadas pelo laser mantendo na luz do vaso a presença de grande concentração de hemácias (Figura 17).

O tecido conjuntivo localizado próximo aos vasos lesados teve ausência de infiltrado inflamatório e presença de poucas hemácias que foram liberadas dos vasos sanguíneos. Houve poucos fibroblastos ativos, macrófagos e presença de grânulos basófilos (corados pela hematoxilina) em meio às células, bem como a presença de fibrilas colágenas aleatoriamente dispostas (Figura 18). O tecido conjuntivo distante da ação do laser apresentou-se com grande número de macrófagos, fibroblastos, poucas fibrilas colágenas e raríssimos capilares sanguíneos (Figura 19). Os vasos linfáticos do tecido conjuntivo encontraram-se dilatados com o lumen vazio (Figura 20).



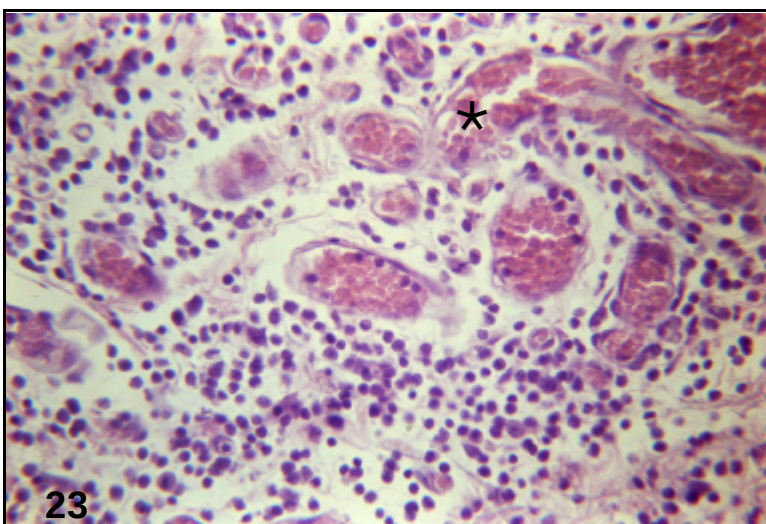
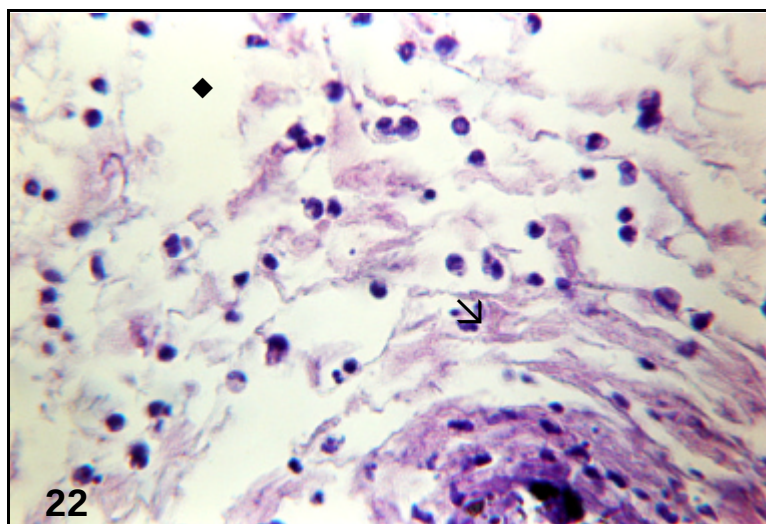
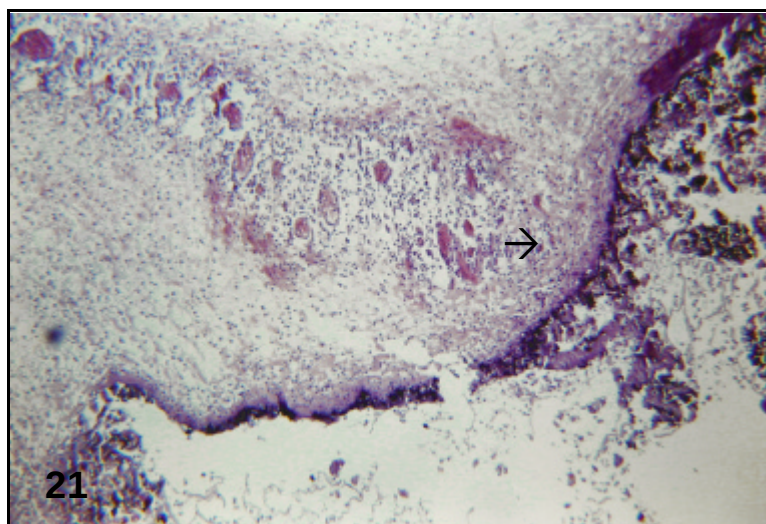


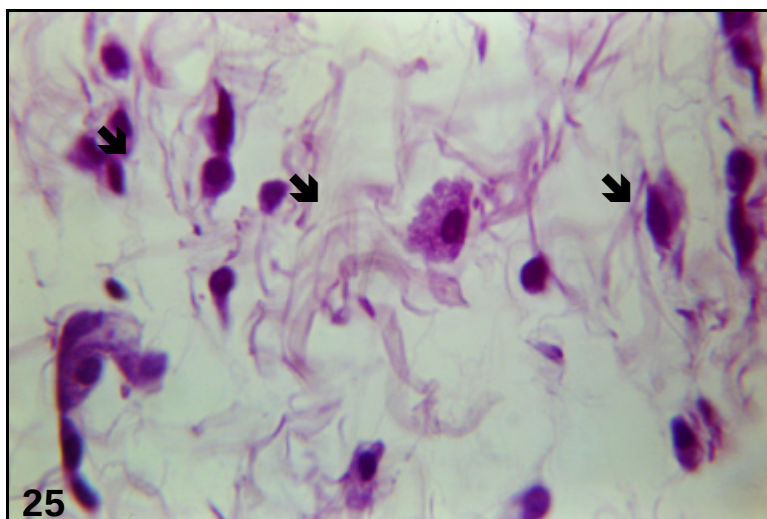
Grupo II - laser de Er:YAG

Período experimental de um dia

Após um dia, a ação do Er:YAG provocou, na superfície do tecido conjuntivo, a formação de fino tecido necrótico (Figura 21). O tecido conjuntivo subjacente esteve rarefeito, com retenção de líquido tissular depositado entre as fibras colágenas provocando seu esgarçamento (Figura 22).

Os vasos sanguíneos reagiram com grande hiperemia, diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo, marginação leucocitária seguida da presença de leucócitos extravasculares formando um infiltrado moderado com polimorfonucleares, rompimento vascular, e este ocorrendo profundamente (Figuras 23 e 24). Também, houve um grande número de macrófagos (Figura 25).

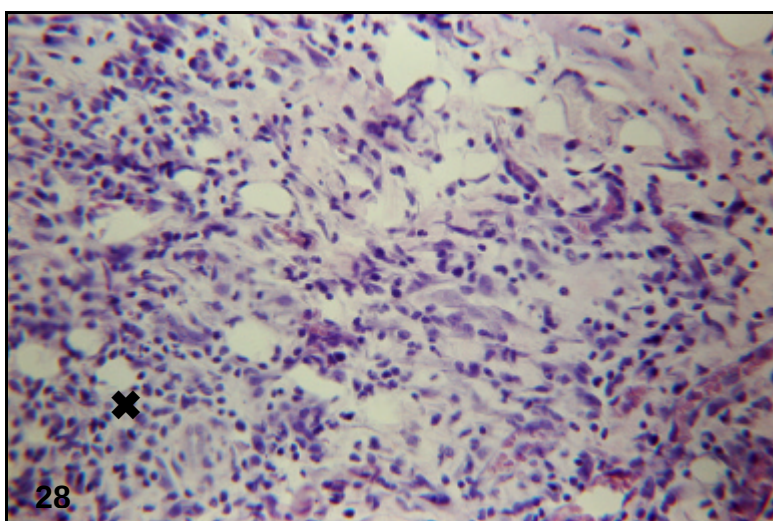
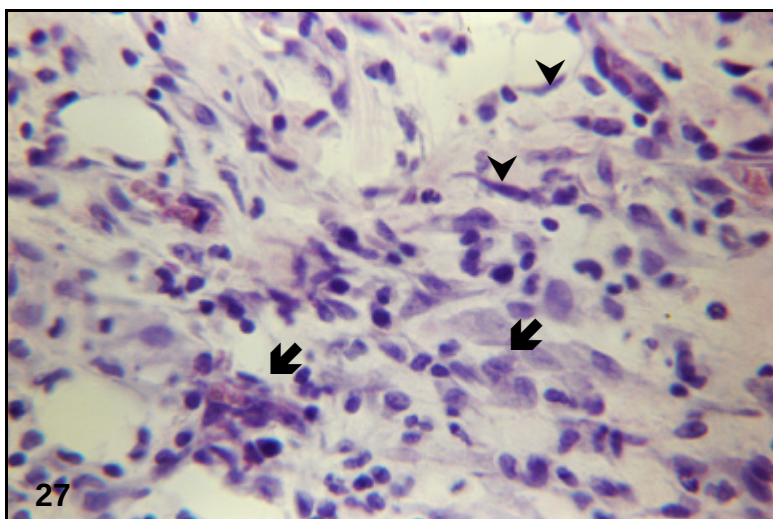
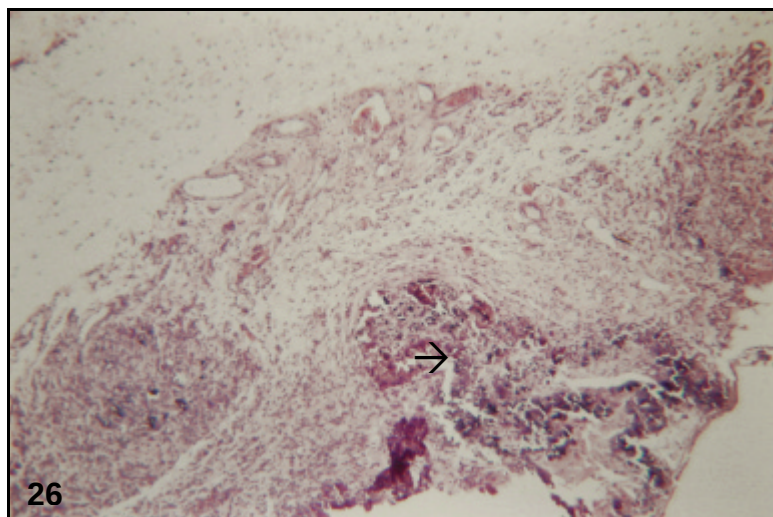


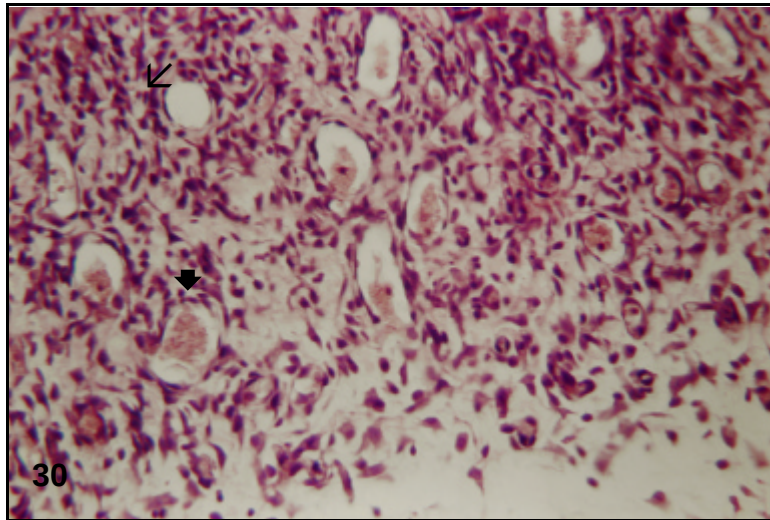
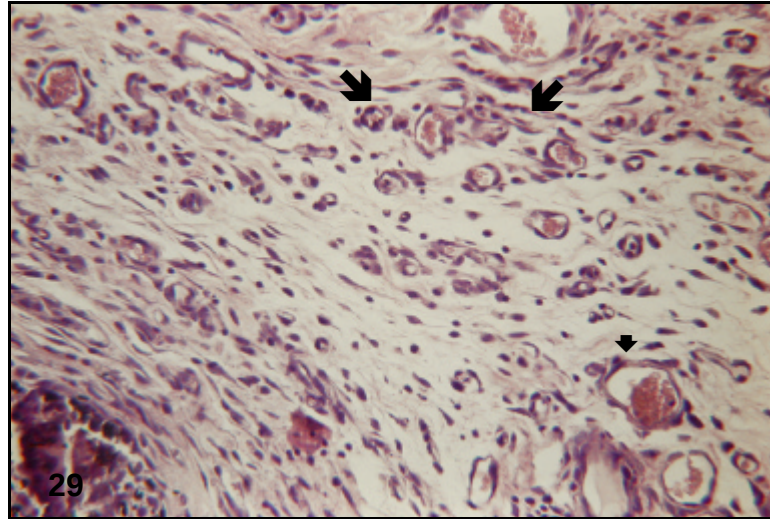


Laser de Er:YAG - Período experimental de sete dias

Aos sete dias o tecido necrótico existente restringiu-se ao centro da lesão e o restante do tecido conjuntivo esteve vital, com grande concentração de células. Houve também a presença de um número considerável de grânulos negros (Figura 26).

Ocorreu a presença de um grande número de fibroblastos ativos produzindo fibrilas colágenas da substância intercelular, macrófagos ativos, células mononucleares representadas pelos linfócitos, intensa angiogênese representada pelos capilares, enquanto os vasos sanguíneos residentes ainda se encontravam hiperemiados (Figuras 27, 28 e 29). Os capilares linfáticos se encontravam ligeiramente dilatados (Figura 30).





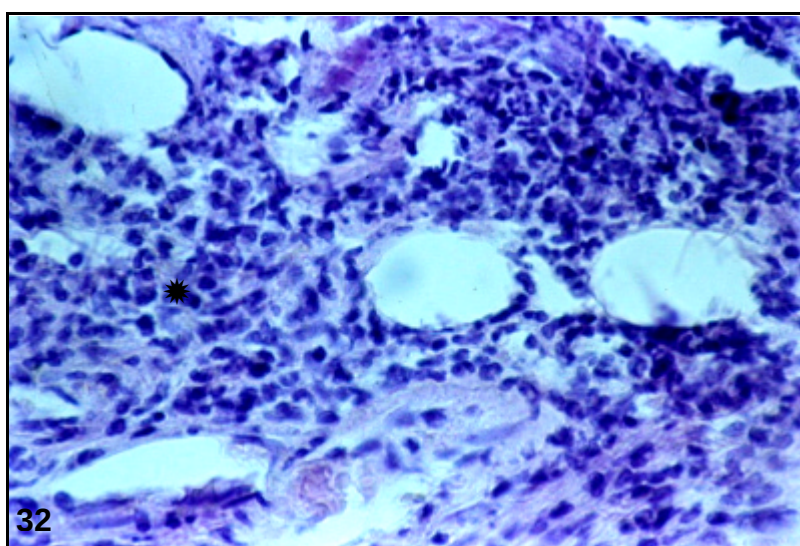
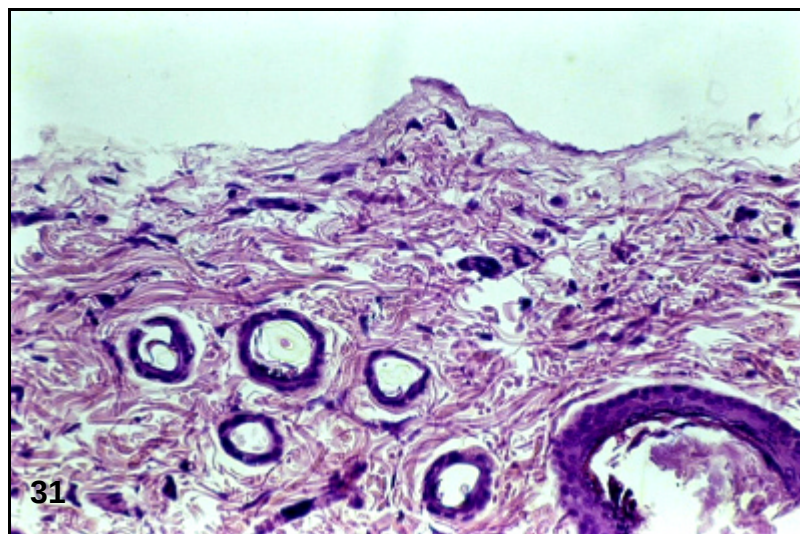
Grupo III – Controle

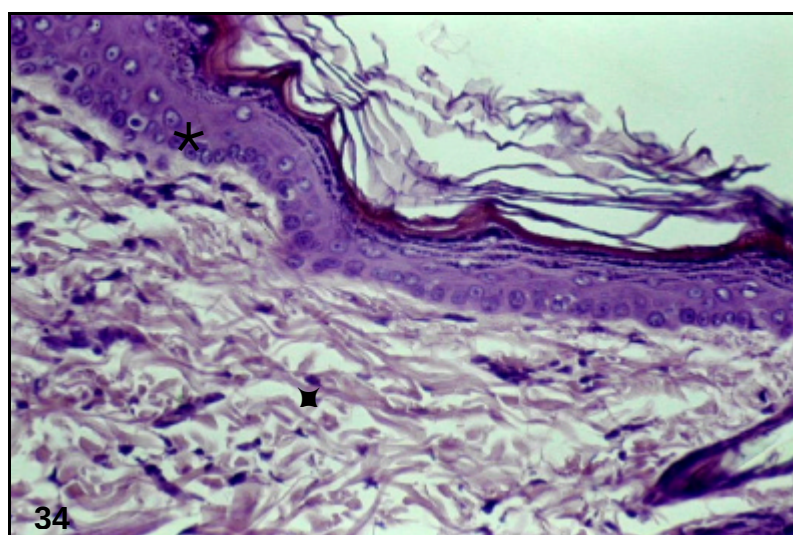
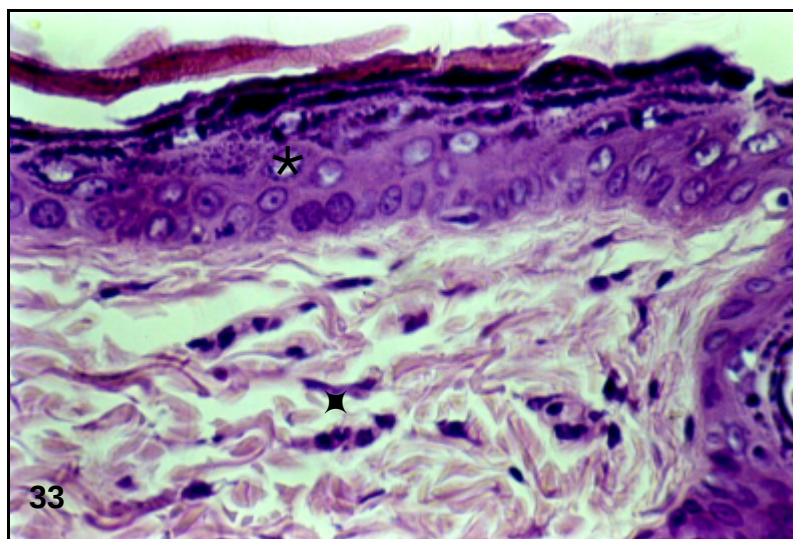
Período experimental de um dia

No período de um dia ocorreu um infiltrado inflamatório de moderado para leve com polimorfonucleares, macrófagos e presença de muitos fibroblastos em meio a delicada rede de fibrina. Salienta-se que as células inflamatórias estavam concentradas na superfície da lesão formando um verdadeiro tampão de células (Figuras 31 e 32).

Período de sete dias

Aos sete dias houve tecido epitelial neoformado cobrindo a lesão com tecido conjuntivo de características normais. Nesse tecido conjuntivo ocorreram esparças células mononucleares representadas pelos linfócitos sem, no entanto, caracterizar inflamação (Figuras 33 e 34).





5.2 Resultados Estatísticos

Na Tabela 2 são mostrados os escores atribuídos à reação do tecido conjuntivo conforme o tecido tenha sido irradiado com laser de CO₂ (GI), ou laser de Er:YAG (GII) ou não tenha sido irradiado (GIII), nos períodos de avaliação: um dia e sete dias.

TABELA 2- Escores atribuídos à reação do tecido conjuntivo de acordo com o grupo experimental e o período de avaliação.

CO ₂		Er:YAG		Controle	
1 dia	7dias	1 dia	7dias	1 dia	7dias
GI(1)	GI(7)	GII(1)	GII(7)	GIII(1)	GIII(7)
3	3	2	1	1	0
3	3	2	1	1	0
3	3	2	1	1	0
3	3	2	1	1	0
3	3	2	1	1	0
3	3	2	2	1	0
3	4	2	2	1	0
3	4	2	2	2	1
3	4	2	2	2	2
4	4	3	2	2	2

A comparação do efeito das irradiações nos dois períodos de avaliação, para cada grupo separadamente, foi realizada pelo teste de Mann-Whitney (Tabela 3). Observa-se que, ao nível de 5% de significância, há evidência estatística para se afirmar que a reação do tecido é diferente no primeiro dia em relação os sete dias para os Grupos II e III, mas não para o Grupo I. Entretanto, não

houve significância ao nível de 1%.

O teste de Kruskal-Wallis, para a comparação, entre os grupos, dos escores atribuídos à reação do tecido separadamente nos períodos de um dia e sete dias, apresentou, respectivamente, os valores 24,3 e 22,8, ambos significativos em um nível menor do que 1%. Portanto, há forte evidência de que pelo menos um posto médio é diferente dos demais, tanto no primeiro período como no segundo período de avaliação. Para identificar os grupos diferentes significativamente, foi empregado o teste de Dunn. Os resultados, para o primeiro e segundo período, também estão na Tabela 3.

Nota-se, pela Tabela 3, que no período de 1 dia o Grupo I é significativamente diferente dos demais ao nível de 5% e que entre os Grupos II e III a diferença não é significativa. Resultado análogo foi obtido no segundo período de avaliação.

Para interpretar melhor e visualizar os resultados acima, foi construída e representada graficamente na Figura 35 a distribuição de freqüências dos escores, de acordo com os grupos e período de avaliação. Verifica-se que, no Grupo I (CO₂), houve prevalência do escore 3 tanto no período de um dia (9 casos) quanto no período de sete dias (6 casos).

No Grupo II (Er:YAG) o escore 2 foi o mais observado no primeiro período de avaliação (9 casos) e no segundo período houve uma distribuição homogênea entre o escore 2 (5 casos) e o escore 1 (5 casos).

No Grupo III (controle), no período de um dia houve predominância do escore 1 (7 casos), porém no período de sete dias o escore 0 foi o predominante (7 casos).

TABELA 3- Comparação da reação do tecido conjuntivo entre os dois períodos de avaliação pelo teste de Mann-Whitney e comparações múltiplas entre grupos pelo teste de Dunn.

Comparação		Significância
Mann-Whitney		
G1(1d)	x G1(7d)	ns
G2(1d)	x G2(7d)	*
G3(1d)	x G3(7d)	*
Dunn		
G1(1d)	x G2(1d)	*
G1(1d)	x G3(1d)	**
G2(1d)	x G3(1d)	ns
Dunn		
G1(7d)	x G2(7d)	**
G1(7d)	x G3(7d)	**
G2(7d)	x G3(7d)	ns

* significativo em um nível entre 1% e 5%

** significativo em um nível menor do que 1%

^{ns} não significativo

Quando se observa os três grupos no período de um dia, nota-se que os mais altos escores foram obtidos pelo Grupo I em comparação aos Grupos II e III, sugerindo, assim, uma reação do conjuntivo mais severa no grupo do CO₂. No período de sete dias, o resultado é análogo.

Nota-se pela Figura 35 que, nos Grupos II e III, houve uma tendência dos escores diminuírem um grau do primeiro período para o segundo, diminuição esta significativa de acordo com o teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). Entretanto, isso não ocorreu no Grupo I.

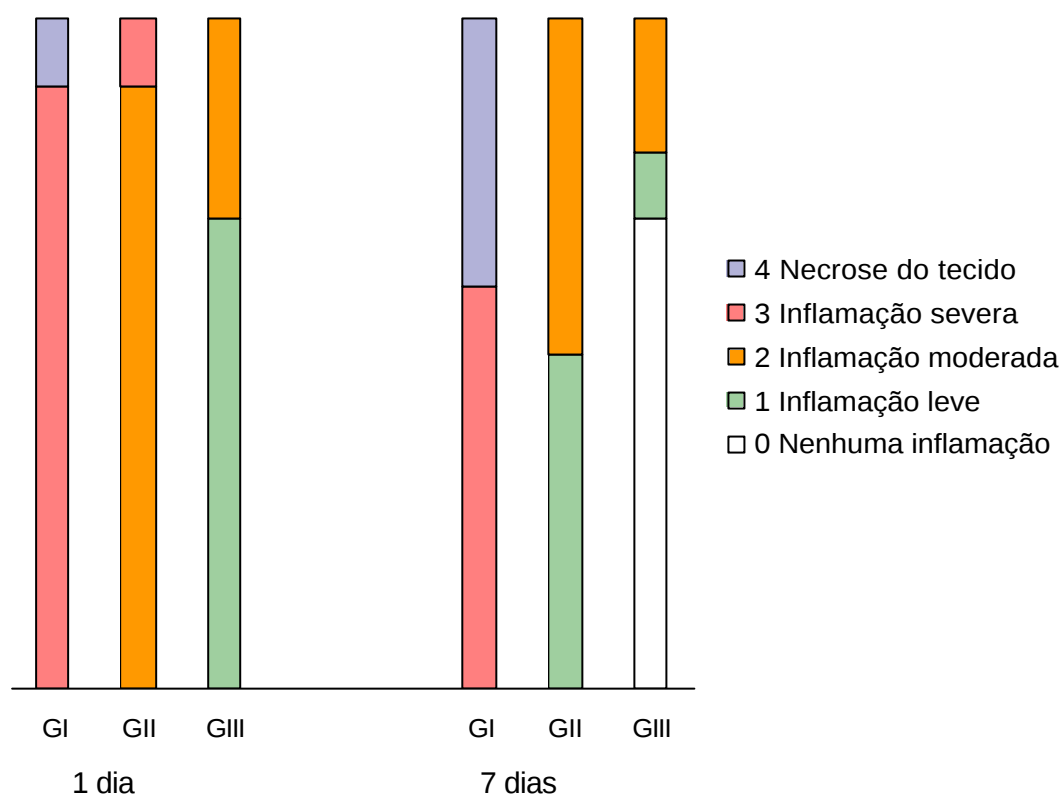


FIGURA 35- Representação gráfica da distribuição de frequências dos escores de acordo com o grupo experimental e o período de avaliação.

Discussão

6.1 Discussão da metodologia

Para a avaliação da ação do laser sobre o tecido conjuntivo, foi realizado o teste para o efeito local após a implantação (ISO 10993-6), de acordo com o Padrão Internacional ISO 7405:1997³⁰ para a avaliação pré-clínica de recursos médicos utilizados na Odontologia.

Os testes para avaliação de um material, medicamento ou terapia que possam ser efetuados em modelos humanos são bastante restritos. Conseqüentemente, modelos alternativos são necessários, justificando, assim, o uso de animais como modelos experimentais. A experimentação animal deve ser conduzida apenas após consideração de sua relevância para a saúde do homem.

Na existência de princípios éticos para a experimentação em animais, esses modelos experimentais são poupados de desconforto, angústia ou dor.⁹ O projeto de pesquisa que deu origem ao presente trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal-CCA da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista.

O rato é amplamente utilizado na avaliação do reparo de tecidos irradiados com os lasers de alta intensidade. A propriedade de corte com hemostasia dos lasers cirúrgicos tem sido amplamente estudada nos tecidos moles da cavidade bucal, pele, músculo e fígado de ratos.^{14,18,22,34,41,50,81,82,83,56,57,38} A reprodução desses animais em laboratório permite a eliminação de fatores individuais, como deficiência imune, ou estar afetados com alguma doença, além de facilitar a obtenção do número de amostras necessário. O rato, por ter um metabolismo bastante acelerado, permite a obtenção de resultados num curto

período de tempo. Para o presente estudo foram selecionados ratos machos devido às variações no ciclo hormonal das fêmeas.

Para a anestesia dos animais foi utilizada a associação do anestésico Ketamina (Francotar) com o relaxante muscular e analgésico Cloridrato de Xylazina (Virbaxyl 2%), dosagem determinada pelo peso do animal, que resulta num efeito anestésico por um período aproximado de uma hora, especificamente em animais de metabolismo intenso como os ratos. O uso da Ketamina, anestésico geral na anestesia de animais de laboratório faz-se em combinação com o relaxante muscular Xylazina, sedativo e analgésico, que atua no sistema nervoso central induzindo o relaxamento muscular.¹⁰

No presente estudo, foram removidas duas secções do epitélio do dorso dos ratos, empregando um *punch* para biópsias de 3 mm de diâmetro, para exposição do tecido conjuntivo e sua posterior irradiação. O *punch* para biópsias tem sido utilizado por Garcia & Milanezi²⁴ (1995) e Garcia et al.²⁵ (1996) para provocar feridas na pele do dorso de ratos, expondo o tecido conjuntivo para a irradiação. A região do dorso do rato também foi escolhida por Rizioi et al.⁵⁹ (1996) e Zweig et al.⁸⁶ (1990) para a avaliação do reparo de feridas realizadas com laser. Rizioi et al.⁵⁹ (1996) compararam o processo de reparo de feridas realizadas na mucosa bucal e na pele de ratos com o laser de ErCr:YSGG, o bisturi e um *punch* para biópsias.

Os sistemas laser utilizados na irradiação dos grupos experimentais foram o CO₂ SL-225 (Medical Energy, INC. Florida, USA) e o Er:YAG Dental Twinlight (Fotona Medical Laser, Ljubljana, Slovevia).

O laser de CO₂ SL-225 é constituído pelo gás de dióxido de carbono, que emite um feixe de luz, com um comprimento de onda de 10,6 µm, localizado na região infravermelha do espectro eletromagnético. Um laser de hélio-neônio funciona como feixe guia. A potência máxima do sistema é de 25 W em emissão contínua e de 90 W em emissão chaveada, com frequência máxima de 99 Hz. A energia é subministrada por um braço articulado.

O laser de Er:YAG Dental Twinlight é um laser de estado sólido, constituído pelo elemento químico érbio, que é utilizado como dopante de uma matriz de ítrio-alumínio-granada. Com um comprimento de onda de 2,94 µm, o feixe está localizado na região infravermelha do espectro eletromagnético. Um laser diodo funciona como feixe guia. A energia máxima por pulso do sistema é de 500 mJ, frequência máxima de 15 Hz. A energia é subministrada por um braço articulado que termina numa peça de mão semelhante a uma caneta de alta rotação, dotada de refrigeração.

A seleção de ambos os sistemas e seus parâmetros de irradiação esteve, principalmente, baseada nos resultados do nosso estudo piloto, onde foi analisada a reação dos tecidos epitelial e conjuntivo do dorso de ratos irradiados com os lasers de CO₂, Nd:YAG, Diodo e Er:YAG. Primeiramente, foram escolhidos os parâmetros de irradiação mais baixos permitidos pelos aparelhos, porém capazes de vaporizar a superfície do tecido. Dentre esses parâmetros foi realizada uma segunda seleção baseada, dessa vez, nos resultados da análise histológica. O laser de CO₂ (1,5 W -50Hz) e de Er:YAG (300 mJ -10 Hz) ocasionaram ablação do tecido provocando menos agressão térmica colateral do que os outros lasers e parâmetros estudados.

Além disso, o laser de CO₂ foi selecionado entre os vários sistemas por ser amplamente estudado nas cirurgias de tecidos moles da cavidade bucal, tanto em animais como em humanos, e por ser também estudado nos tratamentos conservadores da polpa dental.^{12,47,48,58,68,85} Apesar de existirem poucos trabalhos utilizando o Er:YAG em cirurgias de tecido mole na cavidade bucal⁸⁰, esse laser foi escolhido por ser efetivo na remoção de tecido, com mínima agressão térmica aos tecidos adjacentes. No estudo piloto, a irradiação direta do tecido conjuntivo com o laser de Er:YAG promoveu a melhor resposta tecidual comparado a outros lasers, evidenciando o processo de reparo no período de três dias.⁶⁰ Além disso, a peça de mão do Er:YAG Dental Twinlight está acompanhada de um spray de água e ar que, além de limpar, esfria a área alvo diminuindo o incremento de temperatura. Segundo Sonntag et al.⁷⁰ (1996), o spray de água e ar controla os efeitos deletérios do incremento da temperatura na polpa dental durante a ablação de tecido dentário.

O movimento de varredura utilizado durante a irradiação, também empregado por Garcia & Milanezi²⁴ (1995) e Garcia et al.²⁵ (1996), permite uma distribuição homogênea da energia em toda a área a ser irradiada e, em consequência, o mesmo efeito em toda a superfície.

Durante a irradiação foram obedecidas as normas de segurança estabelecidas para o uso dos lasers cirúrgicos, referentes ao cuidado do paciente, pessoal de trabalho, uso do equipamento e local de uso do laser.^{39,54}

O material empregado para a proteção das feridas experimentais e controle sem irradiação foi o cimento Agregado Trióxido Mineral (MTA). A escolha desse material esteve baseada na necessidade de um material que tomasse presa na presença de sangue ou exsudato, permitindo sua permanência *in loco*.^{65,75} Não

existem referências sobre a utilização desse material nas condições do presente estudo. O MTA possui uma grande gama de indicações na odontologia pela sua capacidade de indução ao reparo quando posto em contato direto com o tecido conjuntivo, como nos casos de pulpotomia, perfurações, cirurgias paraendodônticas, dentre outros. Esse fato nos poderia permitir possíveis extrapolações para outras situações.

Após os períodos experimentais de um dia e sete dias, os animais foram mortos por sobredose do anestésico hidrato de cloral¹⁰ e tiveram removidas as peças para tramitação laboratorial. Os cortes de 6 µm de espessura foram corados com hematoxilina/eosina, coloração clássica utilizada na histologia, que se presta para a análise morfológica do tecido, pela qual a eosina cora a substância intercelular (fibras e substância amorfa) e o citoplasma celular de rosa e suas nuances, enquanto a hematoxilina cora os núcleos celulares de roxo e suas nuances.

A análise histológica das amostras foi realizada na microscopia óptica, e os achados classificados em escores segundo a ISO 7405³⁰, uma vez que, pela literatura consultada^{17,31,67}, os escores para conjuntivo pulpar eram semelhantes aos escores utilizados neste trabalho, com a exclusão dos odontoblastos.

6.2 Discussão dos resultados

Diante de uma agressão, o tecido conjuntivo reage com a finalidade de defender e reparar. Essa resposta é basicamente vascular, na qual ocorrem mudanças nos vasos sanguíneos residentes que permitem a presença das células de defesa no local. Quando uma agressão, como o calor excessivo, ocorre a um tecido vivo, desenvolve-se uma reação inflamatória. Inicialmente ocorre uma contração arteriolar de curta duração (poucos minutos), que é seguida pelo relaxamento desses vasos ao redor do tecido agredido. Em consequência, a rede capilar e as vênulas pós-capilares se ingurgitam com fluxo sanguíneo rápido (hiperemia ativa). Um fluido rico em proteínas sai dos vasos e é responsável pelo edema inflamatório. O fluxo sanguíneo, rápido no início, vai ficando mais lento de maneira progressiva, ocasionando estase sanguínea temporal, ocorrendo na inflamação severa de maneira prolongada. Os leucócitos, primeiro neutrófilos e logo os monócitos aderem-se à superfície endotelial das vênulas e emigram através das paredes vasculares aos espaços tissulares num processo chamado diapedese.⁸

A absorção da energia laser depositada no tecido durante a irradiação provoca, inicialmente, um incremento da temperatura. Nos tecidos vivos, o aumento da temperatura ocasiona aquecimento (37-60°C), coagulação (60-90°C), desnaturação protéica (90-100°C), vaporização ou ablação (100°C) e carbonização (>125°C).⁶¹

Na análise histológica de tecidos moles irradiados com finalidade de corte ou ablação, vários autores têm reconhecido diferentes zonas de efeito térmico: uma área de necrose, uma área de coagulação e uma área de tecido não alterado. Essas áreas apresentam-se distribuídas desde o centro até a periferia, criando uma

espécie de círculos concêntricos. Cennty et al.⁷ (1997) descreveram três zonas de tecido conjuntivo afetado distintamente pelo laser de CO₂: a zona de necrose tissular, a zona de efeito térmico com pequenos vasos sanguíneos obliterados por coágulos e inflamação moderada, e zona de tecido não perturbado.

Quando o laser de CO₂ atinge um tecido vivo com uma porcentagem de água de 75%-90%, ocorre uma vaporização localizada.²⁶ A ferida é geralmente coberta por tecido carbonizado e após 24 horas por um coágulo de fibrina. Os vasos sanguíneos e linfáticos de 1mm de diâmetro, na área irradiada, são selados e o número de células inflamatórias aumenta rapidamente devido à reação inflamatória pós-traumática. Durante a cicatrização, fibras colágenas estão presentes, os capilares e as arteríolas se multiplicam na fase proliferativa da reação e os vasos linfáticos proliferam junto com os capilares.^{19,40}

Utilizando um amplo espectro de potências (2W - 20W), a emissão contínua e pulsada do laser de CO₂ tem provocado lesões similares às anteriormente descritas.^{41,63,64,56,71}

No presente estudo, a análise histológica do tecido conjuntivo irradiado com o laser de CO₂ evidenciou a presença de necrose tecidual na superfície irradiada no período de um dia mantendo-se, até os sete dias. No período de um dia também ocorreu uma reação inflamatória severa com a presença, em grande quantidade de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, macrófagos ativos, e hiperemia vascular, de acordo com Luomanen⁴⁰ (1987) e Watanabe et al.^{81,83,82} (1987, 1989, 1990) cujos resultados demonstram epitélio com áreas de necrose e células desorganizadas, hiperemia vascular, hemorragia e presença de neutrófilos polimorfonucleares no período de 24 horas.

A presença de vacúolos intercelulares com líquido tissular descrita na análise do período de um dia também foi observada por Gomes et al.²⁷ (1990), que descreveram uma zona intermédia de vacuolização entre uma zona superficial de tecido carbonizado e uma zona profunda de coagulação.

No período de sete dias, foram observados vasos sanguíneos com suas paredes queimadas e ausência de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo próximo a esses vasos. Esse achado nos permite sugerir que a queimadura dos vasos ocasionou seu selamento imediato evitando, assim, o extravasamento de fluido e células do sangue ao espaço extracelular.

No grupo do CO₂, a reação do conjuntivo mais freqüente foi a inflamação severa, tanto no período de um dia (9 de 10 amostras) como no de sete dias (6 de 10 amostras). Nota-se que, com o passar do tempo, não houve evolução do processo inflamatório, mantendo-se na maioria dos casos (6 amostras) a inflamação severa com tendência à degeneração em 4 amostras.

Segundo a análise estatística pelo teste de Mann-Whitney, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os períodos de avaliação de um dia e sete dias para o laser de CO₂, confirmando os resultados da análise histológica.

Diferentes parâmetros de irradiação podem ser determinados em relação ao efeito desejado (incisão ou ablação). A potência, o tempo de irradiação, o diâmetro do feixe (focalizado ou desfocalizado) e o modo de emissão (pulsada ou contínua) são parâmetros controláveis pelo cirurgião-dentista que podem regular a intensidade da agressão provocada pelos lasers.^{72,14} Apesar dos diferentes parâmetros de irradiação utilizados nas diferentes pesquisas, as características histológicas básicas exibidas pelas lesões provocadas pelo laser de CO₂

permanecem, porém com diferenças na intensidade da reação inflamatória e na cronologia do reparo.

Kardos et al.³³ (1989), Pogrel et al.⁵⁷ (1990), Fortune et al.²³ (1998), Romanos et al.⁶² (1999) observaram tecido de granulação e migração epitelial aos sete dias em incisões realizadas em tecidos moles variadas com o laser de CO₂. Entretanto, Sinha & Gallagher⁶⁹ (2003) observaram, no período de avaliação de 28 dias, áreas de necrose e atraso na epitelização de feridas realizadas na mucosa bucal de porcos com o laser de CO₂. Segundo nossos resultados, no período de sete dias ainda ocorria uma inflamação severa.

Segundo Mausberg et al.⁴³ (1992), a profundidade do efeito do laser de CO₂ está relacionada com a potência utilizada. Feridas realizadas na mucosa bucal com o laser de CO₂ empregando uma potência de 2W repararam-se de maneira mais rápida do que as realizadas com 7W e 10W de potência.⁵⁰

O efeito do laser de Er:YAG em função de seu comprimento de onda (2,94 µm) difere do efeito do laser de CO₂ (10,6 µm). A ação desse laser está baseada no efeito termomecânico, pelo qual o vapor produto da absorção da luz pela água provoca a expansão e fragmentação do tecido. Apesar dessa diferença, Zweig et al.⁸⁶ (1990) descreveram zonas de coagulação e transição similares na irradiação dos lasers de CO₂ e de Er: YAG; porém o diâmetro de ambas as zonas foi significativamente menor com o laser de Er: YAG.

Em nosso estudo, a irradiação com o laser de Er: YAG provocou, superficialmente, necrose tecidual acompanhada de uma reação inflamatória com infiltrado moderado de polimorfonucleares e a presença de macrófagos. No período de sete dias evidenciou-se a presença de um tecido de granulação, denotando processo de reparo, fato que não foi observado no grupo do CO₂.

Nota-se, pelos eventos histológicos ocorridos no grupo do Er:YAG, a prevalência da inflamação moderada (9 de 10 amostras) no primeiro período de avaliação. No segundo período houve diminuição no grau da inflamação de moderada para leve em 5 de 10 amostras e manutenção da inflamação moderada nas 5 restantes. Segundo esses resultados, podemos afirmar que houve evolução da inflamação no grupo do Er:YAG do primeiro período para o segundo período de avaliação. Pelo teste de Mann-Whitney, houve diferença significativa em nível de 5% entre os dois períodos, confirmando os resultados histológicos.

Na descrição das lesões provocadas pelos lasers de CO₂ e de Er:YAG, pôde ser observada certa semelhança dada pela presença de tecido necrosado e degeneração celular na superfície irradiada. Entretanto, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a reação inflamatória ocorrida nesses grupos. No grupo do CO₂, prevaleceu a inflamação severa nos dois períodos de avaliação; entretanto, no grupo do Er:YAG houve prevalência da inflamação moderada no primeiro dia com evolução para inflamação leve, na metade das amostras, no período de sete dias.

Ayhan et al.⁴ (2002) observaram, no período de 10 dias, necrose superficial e degeneração da cartilagem seccionada com o laser de Er:YAG, porém ocorrendo também proliferação de nova cartilagem nesse período de tempo. Entretanto, a zona de carbonização comumente provocada pelo laser de CO₂ não foi observada por Watanabe et al.⁸⁰ (1996) em cirurgias de tecido mole da cavidade bucal realizadas com o laser de Er: YAG, assim como a carbonização também não esteve entre os efeitos provocados pela irradiação do laser de Ho:YAG (λ 2,12 μ m) na mucosa bucal de ratos.³⁴ Segundo esses autores, os lasers de Er: YAG e de Ho: YAG afetam de maneira similar os tecidos.

Outros autores citam que as zonas de agressão térmica (necrose e coagulação) provocadas pelo laser de CO₂ são maiores do que as ocasionadas pelo laser de Er:YAG.^{86,57,33,72,79,28}

O cimento Agregado Trióxido Mineral foi utilizado para proteger todas as feridas. No grupo controle, o MTA foi colocado sobre um tecido conjuntivo que não sofreu a agressão do laser. Nossos resultados revelaram uma inflamação de moderada para leve com a presença de polimorfonucleares, macrófagos e uma grande quantidade de fibroblastos no período de um dia e ausência de inflamação e neoformação epitelial aos sete dias.

O MTA, quando implantado em tubos de dentina no subcutâneo de ratos, ocasionou uma reação inflamatória crônica de suave a moderada no período de sete dias.²⁹ Nesse período de tempo foram observados macrófagos e linfócitos esparsos em capeamentos pulpares realizados em cães com o MTA.⁷³

Os nossos resultados demonstram diferença significativa entre os dois períodos de avaliação ($p < 0,05$). A prevalência da ocorrência da inflamação leve no período de um dia foi substituída pela ausência de inflamação aos 7 dias, indicando a evolução do quadro inflamatório e a menor agressão provocada pelo *punch* sem irradiação.

Na comparação entre os grupos, tanto no primeiro período de avaliação como no segundo, houve diferença significativa entre o laser de CO₂ e de Er:YAG ao nível de 5% e entre o CO₂ e o controle ao nível de 1% de acordo com o teste de Dunn. Em relação ao Er:YAG e ao grupo controle, não houve diferença significativa entre eles em nenhum dos períodos, apesar de haver diferenças na distribuição dos escores entre ambos os grupos.

No período de um dia, para o laser de Er:YAG houve prevalência da inflamação moderada (9 de 10 amostras), no entanto, no grupo controle a prevalência foi da inflamação leve (7 de 10 amostras). Já no período de sete dias, no grupo do Er:YAG houve distribuição homogênea das amostras apresentando inflamação leve e moderada, e no grupo controle a ausência de inflamação foi o evento mais observado (7 de 10 amostras). Porém, essa diferença nas reações inflamatórias entre os grupos II e III não foi considerada significativa pelo teste de Dunn ($p > 0,05$).

Estes resultados concordam com os descritos por Rizioi et al.⁵⁹ (1996), nos quais não houve diferenças morfológicas significativas entre as feridas realizadas com o bisturi, *punch* ou laser em nenhum dos períodos de avaliação.

Em relação à possibilidade de empregar alguns dos lasers testados no presente trabalho na remoção da polpa dental coronária, nossos resultados não são definitivos para poder afirmar que o laser de CO₂ ou de Er:YAG, com os parâmetros de irradiação por nós utilizados, permitiria a remoção do tecido pulpar deixando o tecido remanescente viável para o reparo, ainda que o tecido conjuntivo tenha reagido mais favoravelmente à irradiação do Er:YAG. Deve ser levado em conta a diferença existente entre um tecido com abundante irrigação colateral, como o conjuntivo do dorso de rato, e o conjuntivo pulpar limitado por paredes inextensíveis de dentina. Isto não descarta o uso do laser de alta intensidade nesse tipo de terapia endodôntica, mas salienta a necessidade de novos estudos para determinar constantes físicas adequadas para seu uso.

O fato de o laser de Er:YAG possibilitar a excisão de tecido duro como dentina e esmalte nos permitiria extrapolar sua indicação para a execução da

abertura coronária. A realização desta manobra conjuntamente com a remoção da polpa coronária poderia reduzir o tempo operatório.

Apesar de seu custo ainda elevado para o dia-a-dia clínico devido a suas características físicas, pelos resultados obtidos em nosso trabalho, o Er:YAG apresenta-se como a melhor escolha para futuros estudos mais próximos às condições clínicas.

Conclusão

7. Conclusão

A partir das condições específicas em que foi realizado o presente estudo, os resultados obtidos permitiram-nos concluir que:

o tecido conjuntivo reagiu de forma significativamente mais favorável à irradiação do laser de Er:YAG do que à irradiação do laser de CO₂, independentemente do tempo pós-operatório ($p < 0,05$);

não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo irradiado com Er:YAG e o grupo controle ($p > 0,05$), independentemente do tempo pós-operatório;

o tecido conjuntivo irradiado pelo laser CO₂ apresentou resposta significativamente menos favorável que as dos demais grupos ($p < 0,05$).

Referências

8. Referências *

1. ALAMILLOS-GRANADOS, F. J.; NAVAL-GÍAS, L.; DEAN-FERRER, A.; DEL HOYO, J. A. Carbon dioxide laser vermilionectomy for actinic cheilitis. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.51, n.2, p.118-121, Feb.1993.
2. AOKI, A.; ANDO, Y.; WATANABE, H.; ISHIKAWA, I. In vitro studies on laser scaling of subgingival calculus with an Erbium: YAG laser. **J. Periodontol.**, Chicago, v.65, n.12, p.1097-1106, Dec.1994.
3. ARRASTIA, A. M.; WILDER-SMITH, P.; BERNIS, M. W. Thermal effects of CO₂ laser on the pulpal chamber and enamel of human primary teeth: an in vitro investigation. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.16, n.4, p.343-350, 1995.
4. AYHAN, M.; DEREN, O.; GÖRGÜ, M.; ERDOGAN, B.; DURSUN, A. Cartilage shaping with the Er:YAG laser: an in vivo experimental study. **Annals of Plastic Surgery**, v.49, n.5, p.527-531, Nov. 2002.
5. BAGNATO, V. S. Os fundamentos da luz laser. **Física na Escola**, ¹São Carlos, v.2, n.2, p.4-9, 2001.
6. BARAK, S.; KAPLAN, I. The CO₂ laser in the excision of gingival hyperplasia caused by nifedepine. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.15, n.10, p.633-635, Nov. 1988.
7. CENTTY, I. G.; BLANK, L. W.; LEVY, B. A.; ROMBERG, E.; BARNES, D. Carbon dioxide laser for de-epithelization of periodontal flaps. **J. Periodontol.**, Chicago, v.68, n.8, p.763-769, Aug. 1997.
8. COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: ROBBINS. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 3, p.44-78.
9. CONCIL FOR INTERNATIONAL ORGANIZATIONS OF MEDICAL SCIENCES. International guiding principles of biomedical research involving animals. Genebra, 1985. Disponível em: <<http://www.propp.ufms.br/cmetan1.htm>> Acesso em: 22 set. 2003.
10. CONSEJO CANADIENSE DE PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. La anestesia In: **Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación**. 2.ed. Canadá, 1998. v.1, cap.11, p.1-20.
11. CRISCI, F.S. **Reação histológica de exposições pulpares em dentes de ratos à aplicação do laser de baixa intensidade somente ou em associação ao capeamento com hidróxido de cálcio**. 2002. 192 f.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

Dissertação (Mestrado em Endodontia)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

12. DANG, J.; WILDER-SMITH, P.; PEAVY, G. M. Clinical preconditions and treatment modality: effects on pulp surgery outcome. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 22, n.1, p.25-29, 1998.
13. DOSTÁLOVÁ, T.; JELÍNKOVÁ, H.; KREJSA, O.; HAMAL, D.; KUBELKA, J.; PROCHÁZKA, S.; HIMMLOVÁ, J. Dentin and pulp response to Erbium:YAG laser ablation: a preliminary evaluation of human teeth. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v.15, n.3, p.117-121, 1997.
14. DUARTE, C. A.; NAKAE, K.; GOLDENBERG, S.; ARAUJO, N. S.; LASCALA, N. T. Estudo dos efeitos biológicos do raio laser CO₂ sobre tecidos gengivais de ratos. **Rev. Paul. Odontol.**, São Paulo, n.5, p.50-55, set./out.1984.
15. DUNCAVAGE, J. A.; OSSOFF, R. H. Use of the CO₂ for malignant disease of the oral cavity. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.6, n.5, p.442-444, 1986.
16. EDUARDO, C. P.; GOUW-SOARES, S.; HAYPEK, P. Utilização clínica dos lasers. In: ALVES, R. J. C; NOGUEIRA, E. A. G. **Dentística laser**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. cap. 23, p.439-461.
17. ELLIOT, R. D.; ROBERTS, M. W.; BURKES, J.; PHILLIPS, C. Evaluation of the carbon dioxide laser on vital human primary pulp tissue. **Pediatr. Dent.**, Chicago, v.21, n.6, p.327-331, Sept/Oct.1999.
18. EVRARD, L.; NAMMOUR, S.; DOUROV, N. Scanning eletron microscopic and immunocytochemical studies of contraction during secondary CO₂ laser wound healing in rat tongue mucosa. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.25, n.2, p.72-77, Feb.1996.
19. FRAME, J. W. Carbon dioxide laser surgery for bening oral lesions. **Br. Dent. J.**, London, v.158, p.125-128, Feb. 1985.
20. FRAME, J. W. Removal of oral soft tissue pathology with the CO₂ laser. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.43,n.11, p.850-855, Nov.1985.
21. FIGUEIREDO, J. A. P.; CHAVANTES, M. C.; GIOSO, M. A.; PESCE, H. F.; JANETE, A. D. Pulpotomias com Laser. **RGO**, Porto Alegre, v.43, n.4, p. 197-199, 1995.
22. FONOFF, R.N. **Reparação tecidual da mucosa bucal de ratos submetidos a frenectomia labial com luz laser CO₂ seguida ou não da aplicação de luz laser As-Ga-Al: estudo aos microscópios de luz e eletrônico de varredura**. 2002, 142f. Tese (Doutorado em Odontologia)- Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, 2002. Disponível em:< http://bases.bireme.br/cgi_bin/wxislind.exe/iah/online>. Acesso em: 18 jul. 2003.

23. FORTUNE, D. S.; HUANG, S.; SOTO, J.; PENNINGTON, B.; OSSOFF, R. H., REINISCH, L. Effect of pulse duration on wound healing using a CO₂ laser. **Laryngoscope**, St. Louis, v.108, n.6, p.843-848, June 1998.
24. GARCIA, V. G.; MILANEZI, L. A. Avaliação biométrica de feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos e submetidas ao tratamento com raio laser com diferentes frequências e potências. **Rev. Fac. Odontol. Lins**, Lins, v.8, n.1, p.36-41, jan./jun. 1995.
25. GARCIA, V. G.; OKAMOTO, T.; KINA, J. R. Reparação de feridas cutâneas submetidas ao tratamento com raio laser. Estudo histológico em ratos. **Rev. Odontol. UNESP**, Sao Paulo, v.25, n.1, p. 37-48, 1996.
26. GARCIA, V. G.; THEODORO, L. H. Gengivoplastia com laser CO₂. **Rev. Fac. Odontol. Lins**, Lins, v.11, n.1, p. 38-41, jan./jun. 1998.
27. GOMES, P.O.; WATANABE, I.; MATERA, A.; LOPES, R. A.; GOLDENBERG, A. Efeitos do raio laser CO₂ no pâncreas de cães: estudo à microscopia eletrônica de varredura. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.5, n.2, p.59-65, 1990.
28. HOHENLEUTNER, U.; HOHENLEUTNER, S; BAUMLER, W.; LANDTHALER, M. Fast and effective skin ablation with an Er:YAG laser: determination of ablation rates and thermal damage zones. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.20, n. 3, p.242-247, 1997.
29. HOLLAND, R.; SOUZA, V.; NERY, M. J.; OTOBONI FILHO, J. A.; BERNABÉ, P. F. E.; DEZAN, E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. **J. Endod.**, Chicago, v.25, n.3, p.161-166, March 1999.
30. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION. Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. Test methods for dental materials. ISO 7405:1997(E).
31. JAYAWARDENA, J, A.; KATO, J.; MORIYA, K.; TAKAGI, Y. Pulpal response to exposure with Er:YAG laser. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.91, n.2, p.222-229, Feb. 2001.
32. JUKIC, S.; ANIC, I.; KOBAYASHI, K.; NAJZAR-FLEGER, D.; MATSUMOTO, K. The effect of pulpotomy using CO₂ and Nd:YAG lasers on dental pulp tissue. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.30, N.3, p.175-180, May 1997.
33. KARDOS, T. B.; HOLT, T.; FERGUSON, M. M. Histological evaluation of the effect of a miniature carbon dioxide laser on oral mucosa. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v.18, n.2, p.117-120, Apr. 1989.
34. KAUTZKY, M.; SUSANI, M.; STEURER, M.; SCHENK, P. Soft-tissue effects of the Holmium:YAG laser: an ultrastructural study on oral mucosa. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.20, n.3, p.265-271, 1997.

35. KELLER, U.; HIBST, R.; GEURTSSEN, W.; SCHILKE, R.; HEIDEMANN, D.; KLAIBER, B.; RAAB, W. H. M. Erbium:YAG laser application in caries therapy. Evaluation of patient perception and acceptance. **J. Dent.**, Bristol, v.26, n.8, p.649-656, Nov. 1998.
36. KUTSCH, K. Lasers in dentistry: comparing wavelengths. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.124, n.2, p.49-54, Feb. 1993.
37. LANZAFAME, R. J.; HINSHAW, R. Laser education, laser usage, and laser surgical attitudes: a challenge for the future. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v.10, n.4, p.279-281, Aug. 1992.
38. LANZAFAME, R. J.; NAIM, J. Preliminary assessment of the tissue effects of a 1.44 μ m laser via direct fiber contact on soft tissue. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v.15, n.1, p.23-27, Feb. 1997.
39. LOPES, L. A.; PINHEIRO, A. L. B. Normas de segurança. In: BRUGNERA, A. J.; PINHEIRO, A. L. B. **Lasers na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998. cap.5, p.81-95.
40. LUOMANEN, M. A comparative study of healing of laser and scalpel incision wounds in rat oral mucosa. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.95, n.1, p.65-73, Feb. 1987.
41. LUOMANEN, M.; MEURMAN, J. H. Laser-induced alterations in rat oral mucosa. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.94, n.5, p.452-60, Oct. 1986.
42. MATSUMOTO, K. Lasers in endodontics. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.44, n.4, p.889-906, Oct. 2000.
43. MAUSBERG, R.; VISSER, H.; ASCHOFF, T.; DONATH, K.; KRÜGER, W. Histological comparison of laser and electro-surgery in the palate of pigs. INTERNATIONAL CONGRESS ON LASER DENTISTRY, 3., 1992. **Proceedings...**, p. 205-206, 1992.
44. MELCER, J.; CHAUMETTE, M. T.; MELCER, F.; ZEBOULON, S.; MERARD, R.; PINAUDEAU, Y.; DEJARDIN, J.; WEILL R. Preliminary report on the effect of the CO₂ laser beam on dental pulp of the Macaca Mulata primate and the Beagle dog. **J. Endod.**, Chicago, v.11, n.1, p.1-5, Jan. 1985.
45. MILLER, M.; TRUHE, T. Laser in dentistry: an overview. **J. Am. Dent. Assoc.** Chicago, v.124, n.2, p.32-35, Feb. 1993.
46. MISRA, V.; MEHROTRA, K. K.; DIXIT, J.; MAITRA, S. C. Effect of a carbon dioxide laser on periodontally involved root surfaces. **J. Periodontol.**, Chicago, v.70, p.1046-1052, 1999.
47. MORITZ, A.; SCHOOP, U.; GOHARKHAY, K.; SPERR, W. Advantage of a pulsed CO₂ laser in direct pulp capping: a long-term in vivo study. **Lasers Med. Surg.**, New York, v.22, n.9, p.288-293, 1998.

48. NAMMOUR, S.; CHARLES, T.; POURTOIS, M. A comparison on dogs between two pulp capping techniques: with and without CO₂ laser use. In: **INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY**, 4., 1994. **Proceedings...** Singapore, August 1994.
49. NICOLI FILHO, W. D. **Efeito dos raios laser tipo hélio-neônio (He-Ne) no processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos.** 1999. 56f. Tese (Doutor em Odontologia)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 1999.
50. PATRONICIO, M. C. **Efeitos da radiação laser de Dióxido de Carbono (CO₂) na mucosa de revestimento bucal. Estudo histológico em ratos.** 2000. 62f. Tese (Mestrado em Odontologia)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2000.
51. PECARO, B. C.; GAREHIME, W. The CO₂ laser in oral and maxillofacial surgery. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.41, n.11, p.725-728, Nov. 1983.
52. PICK, R. M.; COLVART, M. D. Current status of lasers in soft tissue dental surgery. **J. Periodontol.**, Chicago, v.64, n.7, p.589-602, July 1993.
53. PICK, R. M.; PECARO, B. C. Use of the CO₂ laser in soft tissue dental surgery. **Lasers Surg Med.**, New York, v.7, n.2, p.207-213, 1987.
54. PINHEIRO, A. L. B. Normas de segurança quando da utilização de laser. **RGO**, Porto Alegre, v.43, n.4, p.227-232, jul/ago. 1995.
55. PINHEIRO, A. L. B. Evolução histórica. In: BRUGNERA, A. J; PINHEIRO, A. L. B. **Lasers na odontologia moderna.** São Paulo: Pancast Editora, 1998. cap. 3, p.19-25.
56. POGREL, M. A.; McCracken, K. J.; DANIELS, T. E. Histologic evaluation of the width of soft tissue necrosis adjacent to CO₂ laser incisions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.70, n.5, p.564-568, Nov. 1990.
57. POGREL, M. A.; YEN, C. K.; HANSEN, L. S. A comparison of carbon dioxide laser, liquid nitrogen cryosurgery, and scalpel wounds in healing. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.69, n.3, p.269-273, Mar. 1990.
58. RAUHAMAAN-MÄKINEN, R.; KOSLOFF, T.; LUOMANEN, M. Effect of a multifunction CO₂-Nd:YAG combination laser on rat dental pulp. In: **INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY**, 4., 1994, Singapore. **Proceedings...**1994.
59. RIZOIU, I. M.; EVERSOLE, L. R.; KIMMEL, A. Effects of an Erbium, Chromium, Yttrium, Scandium, Gallium, Garnet laser on mucocutaneous soft tissue. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.82, n.4, p.386-395, Oct. 1996.

60. RODRÍGUEZ-SOSA, S. A.; BERBERT, F. L. C.; RAMALHO, L. T. O.; LIZARELLI, R.F.Z. Análise histológica do tecido conjuntivo irradiado com os lasers Nd:YAG, Er:YAG e Diodo. Estudo piloto. **Pesq. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.17, n. 2, p.173, ago. 2003.
61. ROMANOS, G. E. Clinical applications of Nd:YAG laser in oral soft tissue surgery and periodontology. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v.12, n.2, p.103-108, Apr. 1994.
62. ROMANOS, G.; SIAR, C. H.; TOH, C. G. A preliminary study of healing of superpulsed carbon dioxide laser incisions in the hard palate of monkeys. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.24, n.5, p.368-374, 1999.
63. ROSSMANN, J. A.; GOTTLIEB, S.; KOUDELKA, B. M.; McQUADE, M. J. Effects of CO₂ laser irradiation on gengiva. **J. Periodontol.**, Chicago, v.58, n.6, p.423-425, June 1987.
64. ROSSMANN, J. A.; McQUADE, M. J.; TURUNEN, D. E. Retardation of epithelial migration in monkeys using a carbon dioxide laser: an animal study. **J. Periodontol.**, Chicago, v.63, n.11, p.902-907, Nov. 1992.
65. SCHIMITT, D.; LEE, J.; BOGEN, G. Multifaceted use of ProRoot MTA root canal repair material. **Pediatr. Dent.**, Chicago, v.23, n.4, p.326-330, 2001.
66. SCHWARZ, F.; SCULEAN, A.; GEORG, T.; REICH, E. Periodontal treatment with an Er:YAG laser compared to scaling and root planning. A controlled clinical study. **J Periodontol.**, Chicago, v.72, n.3, p.361-367, Mar. 2001.
67. SEREBRO, L.; SEGAL, T.; NORDENBERG, D.; GORFIL, C.; Examination of tooth pulp following laser beam irradiation. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.7, n.3, p.236-239, 1987.
68. SHOJI, S.; NAKAMURA, M.; HORIUCHI, H. Histopathological changes in dental pulps irradiated by CO₂ laser: a preliminary report on laser pulpotomy. **J. Endod.**, Chicago, v.11, n.9, p.379-384, Sept. 1985.
69. SINHA, U. K.; GALLAGHER, L. A. Effects of steel scalpel, ultrasonic scalpel, CO₂ laser, and monopolar and bipolar electrosurgery on wound healing in guinea pig oral mucosa. **Laryngoscope**, St. Louis, v.113, n.2, p.228-236, Feb. 2003.
70. SONNTAG, K.; KLITZMAN, B.; BURKES, J.; HOKE, J.; MOSHONOV, J. Pulpal response to cavity preparation with the Er:YAG and Mark III free electron lasers. **Oral Surg. Oral Med. Oral Path. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.81, n.6, p.695-702, June 1996.
71. SPEYER, M.; JOE, J.; DAVISON, J.; OSSOFF, R. H.; REINISCH, L. Thermal injury patterns and tensile strength of canine oral mucosa after carbon dioxide laser incisions. **Laryngoscope**, St. Louis, v.106, n.7, p.845-850, July, 1996.

72. STRAUSS, R. A. Lasers in oral and maxillofacial surgery. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.44, n.4, p.851-873, Oct. 2000.
73. TZIAFAS, O.; PANTELIDOU, A.; BELIBASAKIS, G.; PAPADIMITRIOU, S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.35, p.245-254, 2002.
74. THWE, T.T.; KATO, J.; HASHIMOTO, M.; NAGAI, H.; HASHIMOTO, Y.; ONO, H. Pulp reaction after pulpotomy with He-Ne laser irradiation. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY, 4., 1994, Singapore. **Proceedings...** 1994. p.299-303.
75. TORABINEJAD, M.; HIGA, R. K.; McKENDRY, D. J.; FORD, P. T. R. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. **J. Endod.**, Chicago, v.20, n.4, p.159-163, Apr. 1994.
76. TUFFIN, J. R.; CARRUTH, J. A. S. The carbon dioxide surgical laser. **Br. Dent. J.**, London, v.149, n.9, p.225-258, Nov. 1980.
77. VARANDAS, E.T.; GENOVESE, W. J. O uso do laser de CO₂ em cirurgia bucal. **Rev. ABO Nacional**, São Paulo, v.8, n.2, p.312-317, abr./maio, 2000.
78. VISURI, S. R.; GILBERT, J. L.; WRIGHT, D. D.; WIGDOR, H. A.; WALSH, J. T. Shear strength of composite bonded to Er:YAG laser-prepared dentin. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.75, n.1, p.599-605, Jan. 1996.
79. WALSH, J.T.; FLOTTE, T.J.; DEUTSCH, T.F. ErYAG laser ablation of tissue effect of pulse duration and tissue type on thermal damage. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.9, n.4, p.314-326, 1989.
80. WATANABE, H.; ISHIKAWA, I.; SUZUKI, M.; HASEGAWA, K. Clinical assessments of the Erbium:YAG laser for soft tissue surgery and scaling. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v.14, n. 2, p.67-75, Apr. 1996.
81. WATANABE, I.; LOPES, R. A.; LIBERTI, E. A.; AZEREDO, R. A.; TAKAKURA, C. F. H.; GOLDENBERG, S. Estudo ao microscópio óptico e eletrônico de transmissão na cicatrização de feridas produzidas pelo laser de CO₂ no palato do rato. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.2, n.4, p.108-112, 1987.
82. WATANABE, I.; LOPES, R. A.; MORAIS, J. O. R. Reparação tecidual da mucosa lingual de ratos submetidos à ação do raio laser CO₂. Estudo experimental empregando a microscopia eletrônica de varredura. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.5, n.2, p.76-80, 1990.
83. WATANABE, I.; MORAIS, J. O. R.; GOLDENBERG, S. Estudo das alterações ultra-estruturais da mucosa lingual de ratos incisada com raio laser de CO₂. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.4, n.2, p.74-80, 1989.

84. WIGDOR, H.; ABT, E.; ASHRAFI, S.; WALSH, J. The effect of lasers on dental hard tissues. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, vol.124, n.2, p.65-70, Feb. 1993.
85. WILDER-SMITH, P.; PEAVY, G. M.; NIELSEN, D.; ARRASTIA-JITOSHO, A. CO₂ laser treatment of traumatic pulpal exposures in dogs. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.21, n.5, p.432-437, 1997.
86. ZWEIG, A. D.; MEIERHOFER, B.; MÜLLER, O. M.; MISCHLER, C.; ROMANO, V.; FRENZ, M.; WEBER, H. P. Lateral thermal damage along pulsed laser incisions. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.10, n.3, p.262-274, 1990.

Glossário

Glossário

Ablação: remoção da superfície de um tecido. A ablação é também chamada de vaporização.

Ablação termo-mecânica: quando a energia é absorvida pela água do tecido ocorre vaporização por super aquecimento. O vapor se expande violentamente dentro do tecido, aumentando a pressão interna e produzindo explosão intersticial.

Átomo: a menor partícula que possa existir de um elemento, sozinha ou em combinação.

Braço articulado: aparelho utilizado como meio de direcionar o feixe laser. Tipicamente consiste em braços mecânicos conectados a articulações flexíveis e usualmente unidos por espelhos. A energia laser é refletida por cada espelho até a sua saída do braço.

Coerência: propriedade das ondas eletromagnéticas onde todas são do mesmo comprimento e caminham em fase uma com as outras.

Colimação: propriedade das ondas eletromagnéticas onde todas são paralelas.

Comprimento de onda: distância entre dois pontos correspondentes em uma onda periódica, medido usualmente em micrometros ou nanômetros.

Densidade de energia: a quantidade de energia laser entregue a uma superfície, medida em Joules por centímetro quadrado (J/cm^2).

Emissão estimulada de radiação: é o processo que ocorre quando um fóton indutor de energia interage com um átomo em seu estado excitado, resultando na liberação de dois fótons induzidos.

Frequência: número de oscilações completas de uma onda por segundo.

Fotón: a partícula básica de luz. Um quantum de energia radiante.

Hertz: unidade de frequência em ciclos por segundo.

Joule: uma unidade de energia (J). Quando dividida por 1000 é denominada milijoule (mJ).

Laser: light amplification by stimulated emission of radiation.

Laser pulsado: um laser que emite energia em intervalos fixos.

Laser chaveado: laser que emite energia em intervalos fixos, porém com potência pico menor do que na emissão pulsada.

Laser contínuo: laser que emite energia continuamente. Continuous wave (cw).

Largura de pulso: período de tempo que a energia do laser é emitida em cada pulso.

Meio: um ou mais gases, líquidos ou sólidos utilizados para produzir emissão estimulada de radiação.

Micrometro: milionésima parte de um metro, utilizado para medir o comprimento de onda (μm).

Monocromaticidade: uma única frequência de comprimento de onda (uma cor).

Nanômetro: bilionésima parte do metro, utilizada para medir o comprimento de onda (nm).

Ondas eletromagnéticas: campos magnéticos que variam com o tempo propagando-se pelo espaço

Potência de saída: potência de um laser expressa em Watts.

Radiação: processo de emissão de energia na forma de ondas e partículas. Energia em movimento.

Tempo de exposição: o período total que o tecido é exposto à energia laser.

Autorizo a reprodução deste trabalho

Araraquara, 13 de fevereiro 2004

Sonia Amalia Rodríguez Sosa