



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

DANDARA ANDRADE DE SANTANA

**EFEITO DA FOTOTERAPIA (780 nm) SOBRE O COMPLEXO
DENTINA-POLPA EM UM MODELO DE LUXAÇÃO
EXTRUSIVA DE INCISIVOS DE RATOS**

Vitória da Conquista, BA
2016

DANDARA ANDRADE DE SANTANA

**EFEITO DA FOTOTERAPIA (780 nm) SOBRE O COMPLEXO
DENTINA-POLPA EM UM MODELO DE LUXAÇÃO
EXTRUSIVA DE INCISIVOS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia como requisito para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Cajazeira Aguiar.
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA
2016

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Santana, Dandara Andrade de
Efeito da fototerapia (780 nm) sobre o complexo dentina-polpa em um
modelo de luxação extrusiva de incisivos de ratos / Dandara Andrade de
Santana. – 2016.
58 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Cajazeira Aguiar.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto
Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociência,
2016.

1. Polpa Dentária. 2. Laser. 3. Dentina terciária. 4. Fototerapia. I.
Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em
Saúde. II. Aguiar, Márcio Cajazeira. III. Título.

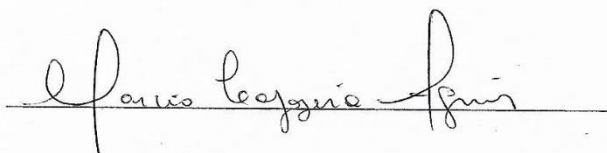
CDU: 616.314

DANDARA ANDRADE DE SANTANA.

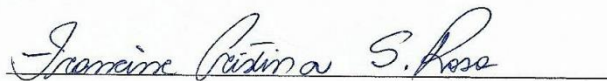
"Efeito do laser GaAlAs 780 nm sobre o Reparo Pulpar em um Modelo de Luxação e Extrusiva em Incisivos de Ratos - Estudo Histológico e Histomorfométrico".

ESTA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOCÊNCIAS E APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA.

VITÓRIA DA CONQUISTA – BA, 20/10/2016.



PROF. DR. MÁRCIO CAJAZEIRA AGUIAR - (ORIENTADOR) - UFBA



PROF. DRA. FRANCINE CRISTINA SILVA ROSA (EXAMINADORA) - UFBA



PROF. DR. ALEXANDRE R. DO ESPÍRITO SANTO (EXAMINADOR) - UFBA

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Márcio Cajazeira Aguiar**, meu orientador, agradeço pela confiança e pelo respeito com o qual me recebeu. Sua dedicação ao ensino e o empenho à pesquisa me contagiaram. Obrigada por ser este grande exemplo.

Agradeço à **Profa. Dra Tania Rodriguez** pelo conhecimento e apoio dispensados. Sua ajuda e contribuição na execução experimental e análise estatística do meu projeto foram imprescindíveis.

Aos professores **Dr. Alexandre Espírito Santo** e **Dra. Deise Vilas Bôas**, agradeço a solicitude e palavras de incentivo. Me senti acolhida.

A **Profa. Dra. Luciana Ramalho**, por disponibilizar o aparelho de laser utilizado na pesquisa. E ao **Prof. Dr. Jean Nunes**, por permitir a realização das etapas de microtomia e coloração no Laboratório de Patologia Cirúrgica Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia.

Sou grata a **Edilson Amâncio** e a **Marleide**, pela disponibilidade e cuidado durante o processo de microtomia e confecção das lâminas.

A **Brenda Nascimento**, **Gabriela Ferraz** e **Isabela Sacramento**, pela companhia e vivência no laboratório. Vocês tornaram tudo mais fácil.

Aos colegas do Mestrado em Biociências por dividir o conhecimento, pelo companheirismo, cumplicidade e gargalhadas. Especialmente a **Ana Cláudia Vinhas**, **Ana Prates**, **Bruna Lago** e **Gladstone Messias**. Foi muito bom reconhecer amigos no caminho da ciência.

Aos alunos da **Turma 2015.2 de Histologia e Embriologia Aplicada à Fonoaudiologia** da UFBA, por me permitir aprender mais do que ensinar durante o tirocínio à docência.

Ao **Instituto Multidisciplinar em Saúde** da Universidade Federal da Bahia, pelo acolhimento e preparo científico.

Ao **Instituto de Ciências da Saúde** da Universidade Federal da Bahia, sobretudo ao **Laboratório de Histotecnologia**, por ceder espaço para realização dos experimentos. Foram longas horas de muito aprendizado.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biociências**, pelo conhecimento e experiência adquiridos.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pelo apoio e investimento.

A **Leonardo Peixoto** pelo companheirismo, pela paciência nas horas em que estive ausente, por toda sua dedicação e amor em tudo que é para mim. Obrigada pelo auxílio na edição e análise das imagens. Eu não saberia sem você.

Aos meus tios **Moacy Andrade** e **Ana Lúcia Andrade**, pela segunda casa que tive durante esses dois anos. A **Ana Camila Andrade**, **Ana Carolina Andrade** e **Candace Andrade**, pelo estímulo e por nunca me permitir desanimar.

Aos meus irmãos, **Gabriel** e **Rafael**, os anjos da minha vida, por nome e merecimento.

Aos meus pais, **Maria Consuelo Andrade** e **Rafael Caricchio**, por me darem asas para voar e sempre um ninho onde pousar. Meu eterno agradecer a cada suor derramado em oferecer a melhor educação a seus filhos. Hoje colho os frutos desta dedicação.

Agradeço a **Deus** por tornar as dificuldades mais fáceis, pela sorte no caminho, pelo olhar atento e por sua divina proteção. Sou uma filha agraciada.

Minhas palavras de gratidão a todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho e que por falta minha não foram citados. Cada palavra, atitude ou gesto me ajudou a subir este degrau. Obrigada.

“Grande coisa é haver recebido do céu uma partícula da sabedoria, o dom de achar as relações das coisas, a faculdade de as comparar e o talento de concluir.”
Machado de Assis

RESUMO

SANTANA, Dandara Andrade de. Efeito da fototerapia (780 nm) sobre o complexo dentina-polpa em um modelo de luxação extrusiva de incisivos de ratos. 58 f. il. 2016. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2016.

O reparo pulpar é um fenômeno no qual o complexo dentina-polpa responde à injúria por meio da deposição de dentina terciária. A fim de regenerar a polpa dentária, muitas estratégias têm sido desenvolvidas como a fototerapia. No reparo pulpar, há dúvidas se a laserterapia pode preservar os odontoblastos primários ou estimular a formação de uma matriz de dentina mais organizada quando a polpa dentária é danificada. O objetivo do presente estudo foi examinar o efeito da fototerapia a laser (λ 780 nm) sobre a vascularização, inflamação, densidade da camada de odontoblastos primários e formação de dentina reacional e reparativa na polpa dentária do incisivo de rato submetido à extrusão. Os incisivos superiores foram extruídos em 3 mm e depois reposicionados em seus alvéolos originais, seguindo da irradiação laser da mucosa palatina ($\lambda = 780$ nm, P = 70 mW, CW, 4,2 J/cm², 60 s) a cada 48 h. Incisivos não traumatizados e/ou não irradiados foram utilizados como controle. Aos 8 e 30 dias após a cirurgia, os incisivos foram processados para análise histológica e histomorfométrica em microscopia de luz. A análise morfológica não revelou diferenças na vascularização entre os grupos, mas mostrou inflamação discreta em alguns espécimes não irradiados e injuriados, o que correlacionou com uma dentina reparativa mais irregular. A avaliação histomorfométrica não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle e laser para densidade de odontoblastos primários e espessura da dentina terciária ($p > 0,05$). O presente estudo mostrou que o laser GaAlAs induziu pequenas alterações no complexo dentina-polpa, com a formação de matriz dentinária mais regular nas polpas dentárias irradiadas.

Palavras-chave: Polpa dentária. Odontoblasto. Dentina terciária. Laser. Terapia com luz de baixa intensidade.

ABSTRACT

Pulp repair is a phenomenon by which the dentin-pulp complex may respond to injury through the deposition of tertiary dentin. In order to regenerate the dental pulp, many strategies have been developed as phototherapy. In the pulp repair, we do not know if GaAlAs laser preserves the primary odontoblasts and stimulate the formation of a more organized dentin matrix when dental pulp is mechanically damaged. The aim of the present study was to examine the effect of laser phototherapy (λ 780 nm) on vascularization, inflammation, density of the primary odontoblast layer and formation of reactionary and reparative dentin in the dental pulp by provoking extrusion of the rat incisor. The upper incisors were extruded 3 mm and then repositioned into their original sockets followed by a laser irradiation of the palatal mucosa ($\lambda = 780$ nm; P = 70 mW; CW; 4,2 J/cm²; 60 s) every 48 h. Non-traumatized and/or non-irradiated incisors were used as the controls. At 8 and 30 days after surgery, incisors were processed for histological and histomorphometric analysis. Morphological analysis revealed no differences in vascularization between groups, but showed discrete inflammation in some non-irradiated and injured specimens, which correlated with a more irregular reparative dentin. The histomorphometric evaluation did not show statistically significant differences between the control and laser groups for primary odontoblast density and tertiary dentin thickness ($p > 0.05$). The present findings revealed that the GaAlAs laser induced small changes on dentin-pulp complex, with more regular dentin matrix in the irradiated dental pulp.

Keywords: Dental pulp. Odontoblast. Tertiary dentin. Laser. Low-level light therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Linha experimental ilustrando os procedimentos experimentais em função do tempo até a eutanásia.....	32
-----------------	--	----

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Distribuição dos animais nos grupos controles e experimentais, considerando a fototerapia laser, o trauma extrusivo e os períodos de obtenção das amostras.....	31
-----------------	---	----

LISTA DE ABREVIACOES

%	Porcentagem
®	Marca registrada
ALP	Fosfatase alcalina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ATP	Adenosina trifosfato
Células /mm ²	Células por milímetro quadrado
CEUA	Comissão de tica no Uso de Animais
cm ²	Centímetro quadrado
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentao Animal
DMP1	Proteína da matriz dentinária 1
EDTA	cido etilenodiaminotetracético
<i>et al</i>	E colaboradores
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
G	Gramas
GaAlAs	Arseneto de gálio e alumínio
GaAs	Arseneto de gálio
HE	Hematoxilina e eosina
HeNe	Hélio-Neônio
HSP	Proteína do choque térmico
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
InGaAlP	Fosfeto de ndio Gálio e Alumínio
J	Joule
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
LAI	Laser de alta intensidade
LASER	Amplificao da Luz por Emissão Estimulada de Radiao
LBI	Laser de baixa intensidade
M	Mol
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
mg/Kg	Miligrama por quilograma
ml	Mililitro

mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
MTA	Trióxido mineral agregado
mW	Miliwatt
n°	Número
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
P	Probabilidade de erro
pH	Potencial hidrogeniônico
PKD	Proteína quinase D
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
W	Watt
W/cm ²	Watt por centímetro quadrado
X	Vezes
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Laser.....	17
2.2 Laser de Baixa Intensidade.....	18
2.3 Efeitos do Laser GaAlAs no Reparo Pulpar.....	20
3 JUSTIFICATIVA.....	25
4 OBJETIVOS.....	28
4.1 Objetivo Geral.....	28
4.2 Objetivos Específicos.....	28
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
5.1 Animais.....	29
5.2 Procedimento Cirúrgico.....	29
5.3 Fototerapia.....	30
5.4 Preparação tecidual.....	30
5.5 Processamento Histológico.....	31
5.6 Análises histológicas.....	31
5.7 Análise histomorfométrica - Densidade da camada de odontoblastos primários e espessura da dentina terciária.....	31
5.8 Análise Estatística.....	33
REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO.....	40
Efeito da fototerapia 780 nm sobre o complexo dentina-polpa em um modelo de luxação extrusiva de incisivos de ratos.....	40
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
ANEXO.....	58

1 INTRODUÇÃO

O reparo do complexo dentina-polpa é um mecanismo de resposta à injúria que pode envolver a deposição de dentina terciária do tipo reacional ou reparativa. Tal resposta é dependente de fatores como intensidade e duração do estímulo irritante e das condições fisiológicas do tecido pulpar (MURRAY *et al.*, 2003; ARANA-CHAVEZ; MASSA, 2004).

Estímulos produzidos por injúrias químicas, mecânicas, térmicas ou biológicas aumentam a atividade secretora dos odontoblastos primários, com formação de dentina reacional. Quando o estímulo é intenso e provoca destruição de odontoblastos primários, observa-se a diferenciação de células *odontoblast-like* com deposição da dentina reparativa (SMITH *et al.*, 1995). Estruturalmente, a dentina reacional mostra uma matriz similar às dentinas primária e secundária, porém com túbulos dentinários mais irregulares, enquanto a matriz de dentina reparativa possui um aspecto distrófico, sem túbulos dentinários, muitas vezes, com células aprisionadas em sua matriz (TZIAFAS, 1994).

A estrutura da dentina terciária formada depende da capacidade do agente agressor de destruir ou não os odontoblastos primários. Em ambos os casos, a matriz de dentina terciária formada aumenta a distância entre o agente irritante e as células pulpares, criando uma barreira protetora. Na clínica odontológica, a proteção do complexo dentina-polpa é realizada por procedimentos que utilizam materiais restauradores e/ou forradores. Contudo, não há material artificial disponível que providencie proteção similar àquela proporcionada pela dentina (GODOY *et al.*, 2007). Desse modo, a formação de uma matriz dentinária mais próxima da dentina fisiológica requer estratégias de tratamento que objetivem manter a vitalidade dos odontoblastos primários.

Com o intuito de manter a vitalidade pulpar e preservar os odontoblastos primários, vários estudos têm utilizado a fototerapia na busca de desenvolver novos métodos terapêuticos que tenham como finalidade a regeneração tecidual e a regulação da dentinogênese durante o reparo pulpar (PRETEL *et al.*, 2009; ABI-RAMIA *et al.*, 2010; FERRIELLO; FARIA; CAVALCANTI, 2010). A terapia com laser de baixa energia, de comprimento de onda vermelho e infravermelho, tem sido apontada como um recurso terapêutico capaz de modular e acelerar o reparo tecidual melhorando as propriedades do tecido neoformado (PINHEIRO, 2009; NICOLA *et al.*, 2003).

O laser diodo arseneto de gálio de alumínio (GaAlAs) vem sendo estudado pela sua capacidade de induzir ou modificar respostas pulpares após injúria (PEREIRA *et al.*, 2012;

FEKRAZAD *et al.*, 2015). No entanto, são poucos os estudos investigando o efeito da terapia com laser GaAIs sobre a inflamação e vascularização pulpare, atividade secretora dos odontoblastos primários e a matriz de dentina terciária formada em dentes injuriados. A matriz de dentina terciária pode ser depositada após injúria pulpar induzida por um trauma extrusivo em incisivos de ratos, constituindo-se num possível modelo experimental para a avaliação do efeito laser GaAIs sobre os odontoblastos e sobre a secreção e estrutura da dentina terciária reacional e reparativa (AGUIAR; ARANA-CHAVEZ, 2007, 2010). O emprego desse modelo experimental pode contribuir para a compreensão do efeito do laser GaAIs sobre a reparo pulpar, cuja literatura disponível é incompleta e não conclusiva.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi examinar o efeito do laser GaAIs sobre a vascularização e o processo inflamatório pulpare, a preservação da camada de odontoblastos primários e formação de dentina terciária após trauma extrusivo de incisivo superior de ratos por meio de avaliações morfológicas descritivas e histomorfométricas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A polpa dentária tem uma alta capacidade de defesa e reparo frente a uma injúria. O fenômeno de defesa pulpar pode ser evidenciado principalmente por meio de três mecanismos, que ocorrem juntos ou de forma independente: indução de um processo inflamatório, formação de esclerose dentinária e deposição de dentina terciária (TZIAFAS; SMITH; LESOT, 2000). Por tratar-se de um tecido bem vascularizado e inervado, a polpa dentária é capaz de reagir a estímulos físicos, químicos ou biológicos, desencadeando um reparo com formação de uma barreira dentinária mineralizada.

A dentina terciária é formada em condições de reparo após estímulos agressivos ao tecido pulpar e pode ser do tipo reacional ou reparativa. A matriz dentinária secretada pelos odontoblastos primários em resposta a uma injúria é do tipo reacional, sendo caracterizada por uma matriz similar à dentina fisiológica, porém com discreto desvio dos túbulos dentinários. A dentina reparativa é secretada pelas células *odontoblast-like*, originadas a partir de células da polpa dentária após a destruição dos odontoblastos primários, sendo caracterizada por seu aspecto distrófico, atubular, originando um tecido, muitas vezes, do tipo osteóide (MURRAY *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 1995). Em ambos os casos, a matriz dentinária formada cria uma barreira protetora que aumenta a distância entre agente irritante e o tecido pulpar.

A polpa dentária em sua região central é formada por numerosos vasos sanguíneos, fibras nervosas e células distribuídas em uma matriz composta por fibras colágenas e rica em substância fundamental. Na sua região periférica, o tecido pulpar apresenta a camada de odontoblastos primários, formada por células dispostas em paliçada e responsáveis por síntese e secreção dos componentes da matriz dentinária (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). A delimitação da cavidade pulpar pelas paredes de dentina confere à polpa dentária proteção contra agentes irritantes externos, apesar de limitar a capacidade de expansão e vasodilatação do tecido pulpar em episódios de injúria.

A proteção do complexo dentina-polpa tem sido realizada pelo uso de agentes artificiais protetores a fim de manter ou recuperar a vitalidade da estrutura dentária. O hidróxido de cálcio e o trióxido mineral agregado (MTA) são utilizados na terapia de polpas vitais por apresentar propriedades biocompatíveis, exercer efeitos antibacterianos e induzir a formação de tecido mineralizado (LI *et al.*, 2015; POGGIO *et al.*, 2015). Na clínica odontológica, a recuperação de um dente é realizada com materiais restauradores e/ou forradores. Contudo, não há material artificial disponível que providencie proteção similar àquela proporcionada pela dentina (GODOY *et al.*, 2007).

Com o objetivo de encontrar formas mais biológicas de estimular a regeneração do tecido pulpar, novas estratégias para tratamento dentário têm sido desenvolvidas, tendo como base a compreensão dos mecanismos moleculares e celulares que regulam a dentinogênese fisiológica e terciária (FERREIRA *et al.*, 2006; PRETEL *et al.*, 2009; TATE *et al.*, 2006). Neste contexto, a inclusão da irradiação laser de baixa intensidade (LBI) como opção terapêutica tem sido largamente difundida, principalmente com intuito de modular a resposta inflamatória e acelerar o processo de reparo pulpar por meio da deposição de dentina terciária.

2.1 Laser

Laser é um acrônimo do inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* de tradução Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação. A radiação emitida é eletromagnética não ionizante que produz uma fonte luminosa com características peculiares que a difere dos demais tipos de luz (PINHEIRO; BRUGNERA JR; ZANIN, 2010). A emissão da radiação laser é monocromática e unidirecional, ou seja, em um único comprimento de onda e direção, e apresenta coerência espacial e temporal, na qual as ondas propagam-se com a mesma fase no espaço e tempo. A trajetória paralela dos fótons em sua propriedade de colimação permite a obtenção de alta densidade de energia em pequenos pontos (TANZI; LUPTON; ALSTER, 2003).

Os dispositivos de laser diferem entre si de acordo com a forma de emissão de energia em seu regime de funcionamento. Lasers contínuos são aqueles que ao serem acionados emitem energia continuamente até serem desligados. Lasers pulsados emitem energia de forma intervalada quando acionados. De acordo com a quantidade de energia emitida e o comprimento de onda utilizado, o laser pode ser classificado em laser de alta intensidade (LAI) e LBI. O LAI ou laser cirúrgico converte luz de variadas frequências com capacidade para gerar energia e calor intensos concentrados em uma pequena área (KIMURA; WILDER-SMITH; MATSUMOTO, 2000). A maior deposição de energia em uma pequena área promove efeitos térmicos e destruição tecidual, portanto são usados em tratamentos cirúrgicos, permitindo o corte, a vaporização e a coagulação dos tecidos.

Por apresentar baixa excitabilidade e menor energia depositada, o LBI regula funções celulares por meio de bioestimulação ou bioinibição das reações químicas e fisiológicas naturais dos tecidos (HUANG *et al.*, 2009). A compreensão dos mecanismos que abrangem a interação entre os diversos lasers e tecidos é fundamentada no entendimento das reações que podem ser induzidas nesses tecidos pela luz laser. A influência desta interação é geralmente

determinada pelas propriedades do laser e pelas características de cada tecido (PINHEIRO; BRUGNERA JR; ZANIN, 2010).

2.2 Laser de baixa intensidade

O LBI surgiu em sua forma moderna logo após a invenção do laser de rubi, em 1960 (MAIMAN, 1960) e do laser de hélio-neônio (HeNe) em 1961 (JAVAN; BENNETT; HERRIOTT, 1961). Em seguida, os efeitos bioestimuladores produzidos por laser de baixa energia foram relatados no reparo tecidual (MESTER E.; MESTER A.F.; MESTER A., 1985), nos fibroblastos (WEBB; DYSON; LEWIS, 1998), na síntese de colágeno (SKINNER *et al.*, 1996) e na regeneração nervosa (ANDERS *et al.*, 1993). Diferente de outros lasers que geram calor, produzindo dano tecidual, o LBI produz reações fotoquímicas nas células (HASHMI *et al.*, 2010).

A terapia laser de baixa intensidade compreende a aplicação da luz nos comprimentos de onda vermelho ou infravermelho (CASTANO *et al.*, 2007). A luz laser pode agir por fenômeno de transmissão, quando a luz atravessa o tecido sem provocar efeito; de reflexão, quando a luz é refletida sem penetração tecidual; de dispersão, quando a luz é espalhada dentro do tecido; ou de absorção, quando a luz emitida é absorvida (CARROLL; HUMPHREYS, 2006). O fenômeno físico pelo qual a luz interage com as células promovendo um efeito sobre o tecido é a absorção, base da laserterapia. Os fótons emitidos são absorvidos pelos cromóforos, substâncias presentes nas mitocôndrias.

A absorção dos fótons emitidos pela luz laser com efeito sobre os processos moleculares e bioquímicos das células constitui o mecanismo de biomodulação ou fotobiomodulação. Quando os fótons emitidos são absorvidos pelos cromóforos biológicos, a permeabilidade celular é alterada e a energia fotônica é convertida em energia química no interior da célula (KARU, 1989). O efeito celular do LBI atua por via mitocondrial deslocando o óxido nítrico da cadeia respiratória e aumentando os níveis de adenosina trifosfato (ATP) e espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas alterações atuam via intermediários de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) e proteína quinase D (PKD) e afetam os componentes no citosol, na membrana celular e no núcleo. No núcleo, elas estimulam a transcrição de genes, exercendo influência na proliferação, migração e inflamação (CARROLL *et al.*, 2014; CHUNG *et al.*, 2012). Dessa forma, os fótons absorvidos podem ser utilizados para fins terapêuticos para produzir estimulação ou inibição da atividade enzimática e de reações fotoquímicas, determinando alterações nos processos fisiológicos.

Para induzir uma adequada resposta biológica, fazem-se necessários alguns ajustes dos parâmetros do laser, os quais estão baseados na profundidade e propriedades do tecido. O comprimento de onda é um dos parâmetros que define a profundidade de penetração no tecido alvo e varia entre vermelho e infravermelho. Deve-se considerar também o tempo e os intervalos de aplicação do laser, assim como a potência (quantidade de energia concedida pelo laser a cada unidade de tempo), a densidade de energia e a taxa de energia depositada. Como a resposta à fototerapia é específica para cada tecido, a eficácia da irradiação depende dos ajustes dos parâmetros do laser de acordo com a resposta bifásica do tecido-alvo. Ou seja, é necessário que a quantidade de energia aplicada seja suficiente para cruzar o limiar que alcance a bioestimulação. Do contrário, quando a quantidade de energia entregue ao tecido é insuficiente ou excessiva, haverá bioinibição (KREISLER *et al.*, 2003).

Adicionalmente, a célula depende do seu estado fisiológico antes da irradiação para desencadear uma resposta ao efeito do laser. Assim, a condição de déficit funcional é um estímulo para a célula responder a ação do laser de forma terapêutica na tentativa de melhorar e regular a atividade celular. Em seu estado normal, não haverá estímulo para que o laser tenha um efeito importante sobre a célula (KARU, 1989). Portanto, o efeito do laser sobre os tecidos será mais benéfico se o tecido é injuriado, porque haverá uma tendência para a célula buscar um estado de normalidade (ALMEIDA-LOPES *et al.*, 2001). Havendo injúria tecidual, os efeitos terapêuticos produzidos pelo laser como estímulo a morfodiferenciação e proliferação celular, redução de edema, aumento de microcirculação local e permeabilidade vascular, são mais pronunciados (KARU, 1989; KREISLER *et al.*, 2003). Em modelos de injúria tecidual, a fotobiomodulação tem atuado na proliferação de fibroblastos (OLIVEIRA SAMPAIO *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2010), no aumento da síntese de colágeno (UTSUNOMIYA, 1998) e numa maior produção de matriz extracelular (PINHEIRO *et al.*, 2011; PUGLIESE *et al.*, 2003).

Na Odontologia, o efeito do LBI sobre tecidos da região maxilo-facial tem sido explorado para diversas finalidades. Estudos relataram efeitos na redução da dor e melhora dos movimentos mandibulares em casos de disfunção temporomandibular (MARINI; GATTO; BONETTI, 2010; MAZZETTO; HOTTA; PIZZO, 2010), melhora do fluxo salivar em condições de xerostomia (LONČAR *et al.*, 2011; PAVLIC, 2012), redução da gengivite (IGIC *et al.*, 2012; PEJCIC *et al.*, 2010), melhoria da osteointegração de implantes dentários (BOLDRINI *et al.*, 2013; OMASA *et al.*, 2012), redução da hipersensibilidade dentinária (GERSCHMAN; RUBEN; GEBART-EAGLEMONT, 1994; ORHAN *et al.*, 2011),

aceleração da remodelação óssea e promoção de analgesia durante o tratamento ortodôntico (DOSHI-MEHTA; BHAD-PATIL, 2012; GENC *et al.*, 2013).

A exposição à irradiação é gerada por aparelhos de laser, diodos emissores de luz e lâmpadas fluorescentes que são nomeados de acordo com o elemento radioativo que eles contêm. Essas substâncias podem estar na forma de cristais sólidos, como o Rubi sintético, na forma de gases, como o Hélio-Neônio ou na forma de semicondutores diodos, como Arseneto de Gálio (GaAs), Fosfeto de Índio Gálio e Alumínio (InGaAlP) e Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs). Os lasers semicondutores diodos são dispositivos eletrônicos simples e acessíveis, desenvolvidos com a finalidade de utilizar comprimentos de onda com níveis de potência superiores capazes de atravessar tecidos moles sem comprometer sua integridade (ALMEIDA-LOPES; MASSINI, 2002).

O GaAlAs é um laser diodo semicondutor com comprimento de onda variando de 760 a 850 nm, situado fora da faixa visível do espectro de luz, especificamente no comprimento infravermelho próximo, com potências variando de 20 a 1000 mW. Na Odontologia, o laser GaAlAs vem sendo utilizado por não alterar a superfície da estrutura dentária, estando indicado para a redução da sensibilidade dolorosa e na estimulação do reparo tecidual em procedimentos cirúrgicos, periodontais e estéticos (OMASA *et al.*, 2012; PEJCIC *et al.*, 2010). Recentemente, o laser GaAlAs tem sido estudado para estimular o reparo pulpar (PRETEL *et al.*, 2009; TATE *et al.*, 2006). Contudo, sua ação biológica sobre a polpa dentária não está completamente esclarecida.

2.3 Efeitos do Laser GaAlAs no Reparo do Complexo Dentina-Polpa

Tendo em vista o interesse da Odontologia pela utilização do laser GaAlAs para o reparo do complexo dentina-polpa, alguns estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* têm relatado o efeito desse tipo de laser sobre células pulpares e matriz dentinária, (FEKRAZAD *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2006; GODOY *et al.*, 2007; MATSUI; TSUJIMOTO; MATSUSHIMA, 2007; MIYATA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2012; PRETEL *et al.*, 2009; RIZZI, *et al.*, 2016; SHIGETANI *et al.*, 2011, 2016; TATE *et al.*, 2006)

Em geral, a influência do laser GaAlAs sobre o tecido pulpar é estudada em células MDPC-23 (linhagem de células *odontoblast-like*) ou em culturas de células extraídas da polpa dentária humana de dentes indicados para exodontia, avaliando a viabilidade e proliferação celular, dosagem de proteína total, atividade da fosfatase alcalina (ALP), expressão genética, expressão de RNAm e a secreção de proteínas envolvidas na formação de matriz mineralizada

(OLIVEIRA et al., 2008; MATSUI; TSUJIMOTO; MATSUSHIMA, 2007; PEREIRA et al., 2012; RIZZI, et al., 2016). Dentre os parâmetros de irradiação utilizados nos estudos *in vitro*, destacam-se comprimentos de onda entre 810 e 980 nm, densidades de energia compreendidas entre 0,32 e 32,47 J/cm² e potências que variaram entre 25,5 e 1000 mW. Os ensaios têm mostrado efeitos positivos na estimulação da resposta celular após aplicação do laser GaAlAs sobre as culturas de células pulpares, principalmente quando pequenas quantidades de energia são empregadas.

A literatura disponível sobre a ação do laser GaAlAs na polpa dentária de humanos é escassa. O efeito da irradiação no reparo pulpar humano tem sido avaliado em preparos cavitários classe I (GODOY *et al.*, 2007) e classe V (FERREIRA *et al.*, 2006). Os achados mostraram resultados positivos sobre a organização das fibras de colágeno e deposição de matriz dentinária terciária. Em modelos *in vivo* utilizando animais, o efeito do laser GaAlAs tem sido avaliado em dentes com exposição pulpar de cães (FEKRAZAD *et al.*, 2015), de macacos (PRETEL *et al.*, 2009) e sobre dentes hígidos de ratos (SHIGETANI *et al.*, 2011, 2016; TATE *et al.*, 2006). Os resultados mostraram alguns efeitos benéficos da fototerapia sobre a dentinogênese terciária. Nos modelos experimentais em humanos e animais, os ajustes do laser GaAlAs utilizados incluíram comprimentos de onda entre 660 e 810 nm, as densidades de energia compreendidas entre 2 e 255 J/cm² e potências que variavam entre 50 e 1500 mW. Os parâmetros mais utilizados foram 810 nm e 4 J/cm² e resultados negativos foram observados quando maiores quantidades de energias foram utilizadas.

No estudo da ação do laser sobre o tecido injuriado, um aspecto importante é a avaliação de sua condição inflamatória, uma vez que a inflamação consiste no primeiro mecanismo de defesa pulpar frente a uma agressão, com a finalidade de eliminar agentes irritantes e permitir o reparo tecidual (SILVA *et al.*, 2009). A polpa dentária é constituída por um tecido conjuntivo não mineralizado. Sempre que a polpa dentária é lesada, espera-se que um processo inflamatório similar àquele observado em outros tecidos conjuntivos ocorra. Contudo, sua localização no interior de uma estrutura dura e inextensível e a formação de um exsudato associado à inflamação podem ocasionar o seu colapso e necrose pulpar. Portanto, condutas devem ser adotadas no intuito de regular o processo inflamatório, impedindo o colapso da polpa dentária, com especial atenção para não interferir na capacidade intrínseca da inflamação de iniciar o reparo pulpar. A redução do processo inflamatório após exposição pulpar foi observada em dentes de cães irradiados com laser GaAlAs 830 nm (UTSUNOMIYA, 1998). Também, reações inflamatórias menos intensas foram encontradas em dentes humanos com preparos cavitários classe V irradiados com laser GaAlAs 670 nm,

50 mW, 4 J/cm² (FERREIRA *et al.*, 2006). Contudo, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na análise morfológica de células inflamatórias em polpas dentárias expostas de macacos irradiadas por laser GaAlAs 688 e 785 nm, 50 mW e 255 J/cm² (PRETEL *et al.*, 2009). Diante dos achados controversos, faz-se necessário aprofundar o conhecimento sobre o efeito do laser GaAlAs sobre o processo inflamatório pulpar.

Em condições de injúria, a vascularização tecidual é mantida por meio da remodelação de vasos sanguíneos existentes para formar novos vasos. As alterações vasculares têm um impacto direto sobre o metabolismo da polpa dentária, especialmente nas alterações no suprimento sanguíneo e na angiogênese (DERRINGER; LINDEN, 2003, 2004). Sabe-se que a angiogênese pulpar, estimulada por fatores de crescimento secretados por células pulpares, precede a formação da dentina terciária (TRAN-HUNG *et al.*, 2008). Pereira *et al.* (2012) sugeriram que o laser GaAlAs 830 nm pode estimular a secreção de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), um fator importante para a formação de novos vasos na polpa dentária, uma vez que células *odontoblast-like* MDPC-23 irradiadas mostraram alta expressão de VEGF164. Logo, considerando a íntima relação entre o aporte sanguíneo e a capacidade secretora das células pulpares, sugere-se que o laser GaAlAs possa induzir a deposição de dentina terciária, principalmente porque estimula a vascularização pulpar.

O laser GaAlAs também tem sido estudado para investigar sua influência sobre vias de sinalização no complexo dentina-polpa. Miyata *et al.* (2006) mostraram ativação do MAPK/ERK (sinalizador para a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular) e inibição dos sinais de estresse celular utilizando células *fibroblast-like* derivadas de polpa dentária humana irradiadas com laser GaAlAs 810 nm, 500 mW, 10 a 90 s. Baixas energias (1 a 10 J) produzidas por um laser GaAlAs 980 nm também foram capazes de ativar a via de sinalização ERK, estimulando a proliferação de odontoblastos (RIZZI *et al.*, 2016). Matsui, Tsujimoto e Matsushima (2007) sugeriram que a potência de 1000 mW do laser GaAlAs 810 nm pode gerar radicais hidroxila que ativam moléculas de sinalização celular, tais como proteína G, estimulando a expressão de HSP (proteína do choque térmico) e ALP, envolvidas na formação de tecido duro. Contudo, um efeito inibitório do laser foi observado no estudo de Pereira *et al.* (2012). Eles observaram um decréscimo na taxa de proliferação celular, quando uma pequena densidade de energia foi aplicada, embora este tenha promovido a expressão do fenótipo de odontoblastos e influenciado positivamente a viabilidade celular.

Alterações regressivas na camada de odontoblastos primários foram observadas após irradiação do laser GaAlAs 810 nm, quando uma maior potência (1500 mW) foi aplicada em dentes de ratos (TATE *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram encontrados por Shigetani

et al. (2011), os quais observaram que uma mesma potência induziu a apoptose de muitos odontoblastos primários. O mesmo laser em baixa potência (500 mW) não destruiu os odontoblastos, mas interferiu levemente na organização da camada destas células. Uma menor retração dos prolongamentos odontoblásticos humanos após preparo cavitário foi observada quando um laser GaAlAs 660 nm com potência de 30 mW foi utilizado (GODOY *et al.*, 2007).

Um aspecto importante do reparo do complexo dentina-polpa é formação de dentina terciária. A deposição da matriz dentinária terciária reacional está relacionada com sinalização intracelular e aumento da atividade secretora dos odontoblastos primários, enquanto a dentina terciária reparativa envolve processos de proliferação, quimitotaxia e diferenciação de novos odontoblastos (SMITH *et al.*, 1995; SODEK; GANSS; MCKEE, 2000). A fim de investigar o efeito do laser GaAlAs sobre esses processos, estudos *in vivo* e *in vitro* têm avaliado a atividade de ALP, expressão de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), colágeno e proteínas não colágenas importantes para a deposição e mineralização da matriz dentinária. O laser GaAlAs 810 nm com potência de irradiação de 1000 mW aplicado em uma linhagem celular da polpa dentária humana promoveu maior atividade de ALP com maior expressão de RNAm para BMPs e ALP (MATSUI; TSUJIMOTO; MATSUSHIMA, 2007). No estudo de Pereira *et al.* (2012), os achados revelaram maiores valores para o teor de proteína total, quantidade de ALP, expressão de colágeno I e proteína da matriz dentinária (DMP1). A expressão de DMP1 também foi estimulada por irradiação laser GaAlAs 810 nm em dentes hígidos de ratos, acompanhada por maior imunorreatividade para osteopontina (SHIGETANI *et al.*, 2016). Em adição, uma melhor organização das fibrilas de colágeno foi observada por Godoy *et al.* (2007), além de uma maior imunomarcagem para fibronectina nos grupos irradiados no estudo de Ferreira *et al.* (2006), embora Oliveira *et al.* (2008) tenham mostrado que a aplicação do laser GaAlAs 830 nm, 90 mW, $0,32 \text{ J/cm}^2$, 3,06 J sobre a linhagem de células MDPC-23 não foi capaz de estimular a síntese de fibronectina, ALP e colágeno.

A produção de moléculas importantes para a formação da matriz dentinária estimulada pela fotobiomodulação com laser GaAlAs parece ser acompanhada pela produção de matriz de dentina terciária. Shigetani *et al.* (2011) mostraram formação de dentina terciária em lesões pulpares induzidas, que variou de acordo com a potência empregada. Os achados de Matsui, Tsujimoto e Matsushima (2007) indicaram que a potência de 1.000 mW promoveu a formação de tecido duro por células da polpa dentária humana. O laser GaAlAs também induziu uma maior taxa de dentinogênese em dentes permanentes imaturos de cães tratados com MTA (FEKRAZAD *et al.*, 2015). No estudo de Ferreira *et al.* (2006) em dentes humanos

com injúria, os resultados mostraram maior deposição de dentina terciária do tipo reacional, enquanto que a maior indução da dentinogênese reparativa foi observada por Shigetani *et al.* (2016) em dentes hígidos de ratos. Embora alguns trabalhos indiquem aumento da dentinogênese após fotobiomodulação, atenção especial deve ser dada ao tipo de matriz produzida pelas células pulpares quando irradiadas com laser, visto que muitos trabalhos mostram a deposição de uma matriz osteóide muito irregular, indicativa de um reparo desfavorável do complexo dentina-polpa (PRETEL *et al.*, 2009; TATE *et al.*, 2006). Portanto, novas pesquisas são necessárias para investigar o efeito do laser sobre o tipo de matriz mineralizada secretada pelas células pulpares.

O efeito do laser GaAIs sobre o complexo dentina-polpa ainda não está definido na literatura científica. Poucos estudos foram realizados e seus resultados apresentam-se conflitantes entre si. A utilização da laserterapia como estratégia para a regeneração do tecido pulpar tem potencial para exploração clínica, pois é possível que seu emprego na clínica possa acelerar a formação de dentina terciária em dentes com injúria pulpar, se o nível de energia e demais parâmetros estiverem adequadamente ajustados para este fim. Ao utilizar parâmetros bioestimuladores, é possível que o laser GaAIs tenha influência positiva na atividade de células pulpares. Entretanto, altas doses de energia podem causar efeitos deletérios e doses de irradiação muito baixas podem não ser suficientes para estimular a resposta pulpar. A variação do comportamento das células irradiadas também pode estar relacionada com o fato dos estudos terem utilizado diferentes modelos experimentais, determinando diferentes respostas teciduais e dificultando a padronização dos parâmetros para o uso do laser no tratamento de injúria pulpar e na indução da dentina terciária.

3 JUSTIFICATIVA

O tratamento da injúria do complexo dentina polpa por agentes físicos, químicos e biológicos requer terapias que preservem a vitalidade do tecido, sendo a matriz dentinária secretada pelos odontoblastos primários a barreira física mais adequada para a polpa. Considerando que não há material artificial disponível que providencie proteção similar àquela proporcionada pela dentina, e que a estratégia mais adequada será aquela que estimule as propriedades regenerativas intrínsecas da polpa dentária, a manutenção dos odontoblastos primários com deposição eventual de matriz de dentina terciária deve ser um objetivo no tratamento dentário restaurador (GODOY *et al.*, 2007).

Na busca por estratégias que estimulem as propriedades regenerativas da polpa após injúria, muitas são as terapias propostas, sobretudo a fototerapia. Baseado nas suas propriedades bioestimuladoras, como promoção da cicatrização, redução de edema, inflamação e dor (CHUNG *et al.*, 2012), sugere-se que o laser de baixa intensidade possa ser uma ferramenta coadjuvante que reduz o período de reparo e evita a desvitalização pulpar, sendo uma alternativa segura, não invasiva e acessível. Estudos utilizando o laser GaAlAs, têm mostrado em modelos *in vivo* o efeito positivo sobre a formação da dentina terciária reparativa (SHIGETANI *et al.*, 2016) e da matriz de dentina reacional, (FERREIRA *et al.*, 2006). No entanto Pretel *et al.* (2009) e Tate *et al.* (2006) aplicando o laser GaAlAs em potências específicas observaram a produção de um tecido osteóide muito irregular desfavorável ao reparo pulpar. Em virtude da diversidade de matriz formada após fotobiomodulação com GaAlAs, mais investigações são necessárias com o intuito de determinar os parâmetros do laser que assegurem a formação de uma matriz dentinária mais próxima da dentina fisiológica, e por isso mais adequada para o reparo do complexo dentina-polpa.

A injúria do complexo dentina-polpa pode resultar numa resposta inflamatória com alterações vasculares que podem evoluir para a necrose pulpar. Alguns trabalhos têm mostrado uma ação anti-inflamatória do laser GaAlAs sobre o tecido pulpar em dentes humanos e de cães (UTSUNOMIYA, 1998; FERREIRA *et al.*, 2006). Contudo, nenhuma diferença intergrupos com relação à intensidade de inflamação foi observada em dentes de macacos submetidos ao preparo cavitário e irradiados com laser GaAlAs (PRETEL *et al.*, 2009). É necessária, portanto, uma maior compreensão da ação anti-inflamatória do laser GaAlAs sobre a polpa dentária. O estabelecimento de uma reação inflamatória é o primeiro mecanismo de defesa do tecido pulpar frente a uma agressão e tem a finalidade de eliminar

agentes patogênicos e permitir o reparo (SILVA *et al.*, 2009). Contudo, a reação inflamatória pode ser prejudicial, considerando que a polpa dentária está localizada dentro de paredes inextensíveis, o que pode favorecer o desenvolvimento da necrose pulpar pelo seu estrangulamento. Um melhor entendimento do efeito do laser GaAlAs sobre a inflamação da polpa dentária é importante, visto que este pode ser uma ferramenta importante para a promoção do reparo do complexo dentina-polpa.

Em condições de injúria, o aumento da vascularização é um evento muito importante para o reparo pulpar, sendo regulada por inúmeros fatores de crescimento (DERRINGER; LINDEN, 2003, 2004). Pereira *et al.* (2012) sugeriram que o laser GaAlAs 830 nm pode ser um indutor de secreção de VEGF (fator de crescimento endotelial), uma vez que as células *odontoblast-like* MDPC-23 expressaram altas taxas de VEGF164 quando irradiadas. Entretanto, trabalhos *in vivo* investigando o efeito do laser GaAlAs sobre a vascularização pulpar são escassos. Sabe-se que durante a regeneração tecidual a formação de novos vasos sanguíneos garante o aporte de nutrientes e se constitui num sistema de eliminação de catabólitos. O aumento da vascularização na polpa dentária precede etapas que são necessárias para a formação da dentina terciária (TRAN-HUNG *et al.*, 2008). Logo, uma possível ação estimuladora do laser GaAlAs sobre a vascularização pulpar pode influenciar positivamente o processo de reparo do complexo dentina-polpa.

Durante o reparo pulpar, a manutenção dos odontoblastos primários é um indicativo de um bom prognóstico, além de estar relacionada com a formação de uma matriz terciária mais próxima da dentina fisiológica. GODOY *et al.* (2007) observaram prolongamentos odontoblásticos mais preservados em dentes humanos submetidos a preparo cavitário e irradiados com laser GaAlAs 660 nm. Por outro lado, numerosos odontoblastos primários apoptóticos tem sido observados em dentes hígidos de ratos irradiados com laser GaAlAs 810 nm (SHIGETANI *et al.*, 2011; TATE *et al.*, 2006). Em adição, muitos estudos empregam modelos experimentais, cuja produção de dentina terciária em resposta à fotomodulação acontece em dentes hígidos, o que indica que o laser, mais do que benéfico, foi um agente agressor àquela polpa dentária (SHIGETANI *et al.*, 2011, 2016; TATE *et al.*, 2006). Por haver resultados divergentes, são necessários estudos *in vivo* que investiguem o efeito do laser sobre a preservação dos odontoblastos primários em situações de reparo do complexo dentina-polpa.

A matriz de dentina terciária pode ser depositada após injúria pulpar induzida por um trauma extrusivo em incisivos de ratos, mostrando-se um modelo experimental adequado para análise do efeito de laser GaAlAs sobre os odontoblastos primários e sobre a secreção e

estrutura da dentina terciária reacional e reparativa (AGUIAR; ARANA-CHAVEZ, 2007, 2010). O modelo permite avaliar o comportamento da polpa dentária sem riscos de interferência das agressões químicas e da contaminação bacteriana provocada pela exposição pulpar, além de quantidades variáveis de dentina reacional e reparativa, as quais estão relacionadas com o grau de injúria e poder de recuperação do tecido pulpar.

O processo pelo qual o complexo dentina-polpa é reparado após um trauma dentário não está completamente entendido e a inexistência de um protocolo padrão para uso do laser no tratamento da injúria dificultam a avaliação do efeito do laser GaAlAs no complexo dentina-polpa. Sendo assim, considerando as evidências de que o laser GaAlAs pode estimular muitas das propriedades importantes para o reparo tecidual e a escassez de trabalhos avaliando o seu efeito sobre o reparo do complexo dentina-polpa, o presente estudo se propôs a testar a hipótese de que o laser GaAlAs 780 nm preserva a camada de odontoblastos primários, reduz a inflamação e aumenta a vascularização pulpar, com impacto sobre a produção de dentinas terciárias reacional e reparativa em um modelo experimental de injúria pulpar sem interferência de agentes agressores químicos e/ou bacterianos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o reparo do complexo dentina-polpa após injúria induzida por um movimento extrusivo dos incisivos superiores de ratos, seguido de fototerapia com laser GaAlAs 780 nm.

4.2 Objetivos Específicos

Avaliar, em incisivos superiores de ratos de ratos *Wistar* submetidos à injúria do complexo dentina-polpa por movimento extrusivo, os efeitos do laser do laser GaAlAs sobre:

- A vascularização e a inflamação da polpa dentária por meio de análise morfológica descritiva com microscopia de luz;
- A camada de odontoblastos primários e a matriz de dentina terciária formada em decorrência do trauma induzido por meio de análises morfológicas descritiva e histomorfométricas com microscopia de luz.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com os princípios de cuidado aos animais de laboratório (Publicação NIH 85-23, 1985) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, Brasil (Protocolo nº 054/2014).

Trinta e três ratos *Wistar* machos com peso entre 200 e 250g foram divididos aleatoriamente em grupos. Um grupo foi constituído por dentes submetidos à extrusão e irradiados com laser. Outro grupo compreendeu dentes não traumatizados e tratados com laser. Os dentes não irradiados foram divididos em outros dois grupos (extrusão e não extrusão). Todos os grupos foram ainda subdivididos de acordo com o período de eutanásia. Com base nos princípios de utilização de animais na investigação científica (Os três Rs), os subgrupos constituídos por dentes não irradiados e não traumatizados (8 e 30 dias) foram constituídos pelos mesmos animais, uma vez que não foram submetidos ao trauma ou irradiados com laser (RUSSELL; BURCH, 1959) Dois dentes (um dente de cada grupo) foram perdidos em virtude problemas causados pelo processamento histológico ou técnica cirúrgica (Tabela 1).

Tabela 1 Distribuição do número de animais em diferentes períodos de tempo experimental, de acordo com a irradiação laser e a luxação extrusiva.

Período de tempo	Grupos			
	Controle		Laser	
	Sem extrusão	Extrusão	Sem extrusão	Extrusão
8 dias		n= 5	n= 5	n= 4
30 dias	n= 4	n= 5	n= 5	n= 5

5.2 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma combinação de cloridrato de cetamina (Cetamin®, Syntec, Santana de Parnaíba, SP) e xilazina (Xilazin®, Syntec, Santana de Parnaíba, SP) em concentrações de 10 e 1,4 mg por 100 g de peso corporal, respectivamente. Após assepsia com solução alcoólica de iodo, 2 mm da borda incisal foram desgastados com uma broca cilíndrica diamantada. Foi realizada sindesmotomia em torno dos incisivos superiores direito com instrumental Holleback 3S modificado (Golgran, SP), seguido da extrusão de 3 mm com fórceps pediátrico adaptado nº 151 (Golgran, SP). Estes dentes foram cuidadosamente reposicionados às suas posições originais.

O comprimento da borda incisal desgastada e a quantidade de deslocamento dos dentes durante a extrusão foram medidos com uma régua endodôntica milimetrada. Os ratos foram alimentados com Nuvital® (Nuvital®, Curitiba, PR, Brasil) e água *ad libitum*. Os ratos portadores dos incisivos luxados foram mantidos com ração moída por 8 dias após o procedimento cirúrgico.

5.3 Fototerapia

Para realizar a fototerapia, os animais foram anestesiados com a mesma substância utilizada para a indução da luxação extrusiva, aplicando metade da dose inicial, uma vez que este procedimento não foi invasivo e exigiu um tempo mais curto. A fototerapia foi realizada com laser diodo GaAlAs (Twin Flex®, MM Optics, São Carlos, SP), de acordo com os parâmetros mostrados na Tabela 2. A fototerapia foi iniciada imediatamente após o trauma extrusivo (dia 1) e repetiu-se em intervalos de 48 horas durante 7 ou 15 dias, totalizando 4 e 8 sessões no período experimental de 8 dias e 30 dias, respectivamente (Figura 1). O tempo de exposição foi de 60 s, aplicando-se de forma pontual e perpendicular à superfície da mucosa mastigatória palatina do incisivo superior direito.

Tabela 2 Resumo dos parâmetros do laser utilizados no estudo.

Parâmetros	Laser
Comprimento de onda (nm)	780
Densidade de energia (por sessão) (J/cm ²)	4.2
Densidade de energia (4 sessões) (J/cm ²)	16.8
Densidade de energia (8 sessões) (J/cm ²)	33.6
Potência (mW)	70
Área irradiada (cm ²)	1
Tamanho do spot (cm ²)	0.04
Tempo de exposição (por sessão) (s)	60

5.4 Preparação tecidual

Oito ou trinta dias após o procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados. Imediatamente, as hemimaxilas contendo os incisivos maxilares direitos foram removidas e colocadas em fixador contendo 4% de formaldeído a pH 7,2 em tampão PBS 0,1 M. Após a remoção de todos os tecidos moles, as hemimaxilas direitas foram imersas num béquer

contendo 40 mL de fixador à temperatura ambiente, o qual foi posteriormente colocado num recipiente de vidro maior cheio de gelo e imediatamente inserido dentro de um forno de micro-ondas (PMS12N2). A seguir, os espécimes foram irradiados por três períodos de 5 min com a temperatura programada para o máximo de 36 °C em um micro-ondas ajustado para 60% de potência. Após a irradiação, as amostras foram transferidas e mantidas *overnight* em fixador fresco a 4° C. Então, foram lavadas em tampão PBS 0,1 M, pH 7,2, durante 60 minutos.

Em seguida, todas as hemimaxilas foram descalcificadas numa solução aquosa de 4,13% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A solução descalcificante foi trocada a cada 2 dias. Após descalcificação, as hemimaxilas foram lavadas em tampão PBS, pH 7,2.

5.5 Processamento histológico

Após descalcificação e lavagem, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e incluídas em parafina. Os cortes semi-seriados (5 µm de espessura) foram cortados no plano sagital, isto é, paralelos ao eixo longitudinal do dente, permitindo a padronização das amostras para estudo histomorfométrico. Em seguida, as seções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE).

5.6 Análises histológicas

A análise morfológica descritiva das seções foi realizada em microscópio óptico (BX-51, Olympus®, Japão) com uma câmera acoplada, conectada a um computador por um observador cego e compreendeu apenas a interface dentina-polpa localizada entre 400 µm e 900 µm da extremidade apical do incisivo superior. Descreveram-se as características da matriz dentinária extracelular e células relacionadas à interface dentina-polpa ao longo dos dois períodos pós-trauma, observando-se a presença de inflamação, vascularização, espessura e tipo de dentina terciária e irradiação laser.

As imagens das seções histológicas foram capturadas pelo *software Analysis Get It* através de um sistema formado por uma câmera digital (DP71, Olympus®, Japão) e um microscópio de luz.

5.7 Análise histomorfométrica - Densidade da camada de odontoblastos primários e espessura da dentina terciária

Na análise histomorfométrica dos dentes não traumatizados, a região capturada compreendeu uma porção localizada a 400 µm da extremidade apical do incisivo. Nos dentes

injurados, a área capturada compreendeu uma porção localizada a 400 μm da extremidade apical da linha cálcio-traumática. A linha cálcio-traumática é uma linha basofílica entre a dentina formada antes da injúria pulpar e a dentina terciária.

Três secções de HE da região mais central da polpa dentária foram selecionadas, considerando a sua representatividade e a ausência de artefatos. Para cada grupo foram capturadas imagens de interface dentina-polpa com 100 x de ampliação. A contagem de células foi medida numa área de 0,3 mm^2 definida pelo *software CorelDraw® Graphics Suite X7*. A densidade celular foi obtida após conversão da quantidade de odontoblastos primários em número de células por unidade de área (células / mm^2). Todas as secções foram analisadas por dois examinadores cegos e calibrados.

Durante a contagem celular, o reconhecimento da camada de odontoblastos primários foi baseado na sua localização da polpa dentária (os odontoblastos primários são originalmente as células situadas entre a matriz dentinária e o tecido pulpar) e sua morfologia celular. Apenas as células intactas apresentando um núcleo claramente identificável foram incluídas no estudo. Morfologicamente, os odontoblastos primários são células colunares polarizadas com núcleos excêntricos e processos celulares longos. As células cúbicas localizadas perto da matriz da dentina foram excluídas.

A espessura da dentina terciária depositada após o trauma extrusivo foi estimada histomorfometricamente por dois observadores independentes nas mesmas imagens capturadas para a contagem dos odontoblastos primários.

A medição da espessura da dentina terciária foi realizada com o *software CorelDraw® Graphics Suite X7*, traçando nas imagens digitais uma linha perpendicular entre a linha cálcio-traumática e a interface dentina-polpa. O comprimento da linha em mm foi considerado como a espessura da dentina terciária. Em seguida, a espessura da dentina terciária foi convertida em micrômetros (μm).

Para a espessura da dentina terciária, o critério histomorfométrico foi a diferença estrutural entre dentina fisiológica e dentina terciária (reacional e reparativa) separadas pela linha cálcio-traumática. A linha cálcio-traumática foi considerada como uma linha clara que marcou o momento da aplicação do trauma, separando as matrizes da dentina fisiológica e da dentina terciária. A matriz fisiológica da dentina foi caracterizada pela sua aparência tubular regular, associada aos odontoblastos primários. A matriz dentinária reacional foi similar à dentina fisiológica, mas apresentando túbulos dentinários mais irregulares, associados aos odontoblastos primários resistentes à injúria (ARANA-CHAVEZ; MASSA, 2004) Considerou-se como dentina reparativa aquela secretada por células *odontoblast-like* após o

desaparecimento de odontoblastos primários. Apresentava uma matriz desorganizada e distrófica, sem túbulos dentinários, por vezes, mostrando células aprisionadas [SMITH *et al.*, 1995; TZIAFAS, 1994).

5.8 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando SPSS v. 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). A análise da variância intergrupo foi determinada com o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*. O teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para comparar separadamente dois grupos independentes, enquanto as diferenças dentro do mesmo grupo para o período de tempo foram analisadas com o teste de *Wilcoxon*. Os dados foram descritos utilizando mediana e intervalo interquartil (IQRs 25-75) e diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

REFERÊNCIAS

ABI-RAMIA, L. B.; STUANI, A. S.; STUANI, A.S.; STUANI, M. B.; MENDES ADE, M. Effects of low-level laser therapy and orthodontic tooth movement on dental pulps in rats. **Angle Orthodontics**, v. 80, n. 1, p. 116-122, 2010.

AGUIAR, M. C.; ARANA-CHAVEZ, V. E. Immunocytochemical detection of dentine matrix protein 1 in experimentally induced reactionary and reparative dentine in rat incisors. **Archives of Oral Biology**, v. 55, n. 3, p. 210-214, 2010.

_____. Ultrastructural and immunocytochemical analyses of osteopontin in reactionary and reparative dentine formed after extrusion of upper rat incisors. **Journal of Anatomy**, v. 210, n. 4, p. 418-427, 2007.

ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R. A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M. M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2001.

ALMEIDA-LOPES, L.; MASSINI, R. J. **Laser therapy, concepts and applications**. São Carlos, 2002.

ANDERS, J. J.; BORKE, R. C.; WOOLERY, S. K.; VAN DE MERWE, W. P. Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 72-82, 1993.

ARANA-CHAVEZ, V. E.; MASSA, L. F. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 8, p. 1367-1373, 2004.

BOLDRINI, C.; DE ALMEIDA, J. M.; FERNANDES, L. A.; RIBEIRO, F. S.; GARCIA, V. G.; THEODORO, L. H.; PONTES, A. E. Biomechanical effect of one session of low-level laser on the bone-titanium implant interface. **Lasers in Medical Science**, v. 28, p. 349-352, 2013.

CARROLL, J. D.; MILWARD, M. R.; COOPER, P. R.; HADIS, M.; PALIN, W. M. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. **Dental Materials**, v. 30, n. 5, p. 465-475, 2014.

CARROLL, L.; HUMPHREYS, T. R. Laser-tissue interactions. **Clinics in Dermatology**, v. 24, n. 1, p. 2-7, 2006.

CASTANO, A. P.; DAI, T.; YAROSLAVSKY, I.; COHEN, R.; APRUZZESE, W. A.; SMOTRICH, M. H.; HAMBLIN, M. R. Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, n. 6, p. 543-550, 2007.

CHUNG, H.; DAI, T.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y. Y.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 2, p. 516-533, 2012.

DERRINGER, K. A.; LINDEN, R. W. Angiogenic growth factors released in human dental pulp following orthodontic force. **Archives of Oral Biology**, v. 48, p. 285-291, 2003.

_____. Vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor 2, platelet derived growth factor and transforming growth factor beta released in human dental pulp following orthodontic force. **Archives of Oral Biology**, v. 49, p. 631-641, 2004.

DOSHI-MEHTA, G.; BHAD-PATIL, W. A. Efficacy of low-intensity laser therapy in reducing treatment time and orthodontic pain: a clinical investigation. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 141, p. 289-297, 2012.

FEKRAZAD, R.; SERAJ, B.; GHADIMI, S.; TAMIZ, P.; MOTTAHARY, P.; DEHGHAN, M. M. The effect of low-level laser therapy (810 nm) on root development of immature permanente teeth in dogs. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 4, p. 1251-1257, 2015.

FERREIRA, A. N.; SILVEIRA, L.; GENOVESE, W. J.; DE ARAÚJO, V. C.; FRIGO, L.; DE MESQUITA, R. A.; GUEDES, E. Effect of GaAIIAs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 3, p. 358-365, 2006.

FERRIELLO, V.; FARIA, M. R.; CAVALCANTI, B. N. The effects of low-level diode laser treatment and dental pulp-capping materials on the proliferation of L-929 fibroblasts. **Journal of Oral Science**, v. 52, n. 1, p. 33-38, 2010.

GENC, G.; KOCADERELI, I.; TASAR, F.; KILINC, K.; EL, S.; SARKARATI, B. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on orthodontic tooth movement. **Lasers in Medical Science**, v. 28, p. 41-47, 2013.

GERSCHMAN, J. A.; RUBEN, J.; GEBART-EAGLEMONT, J. Low level laser therapy for dentinal tooth hypersensitivity. **Australian Dental Journal**, v. 39, p. 353-357, 1994.

GODOY, B. M.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; NÚÑEZ, S. C.; RIBEIRO, M. S. Effects of low-power red laser on dentine-pulp interface after cavity preparation. An ultrastructural study. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n. 9, p. 899-903, 2007.

HASHMI, J. T.; HUANG, Y. Y.; SHARMA, S. K.; KURUP, D. B.; DE TABOADA, L.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. Effect of pulsing in low-level light therapy. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 6, p. 450-466, 2010.

HUANG, Y. Y.; CHEN, A. C.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose response**, v. 7, n. 4, p. 358-383, 2009.

IGIC, M.; MIHAILOVIC, D.; KESIC, L.; MILASIN, J.; APOSTOLOVIC, M.; KOSTADINOVIC, L.; JANJIC, O. T. Cytomorphometric and clinical investigation of the gingiva before and after low-level laser therapy of gingivitis in children. **Lasers in Medical Science**, v. 27, p. 843-848, 2012.

- JAVAN, A.; BENNETT, W. R.; HERRIOTT, D. R. Population Inversion and Continuous Optical Maser Oscillation in a Gas Discharge Containing a He-Ne Mixture. **Physical Review Letters**, v. 63, p. 106-110, 1961.
- KARU, T. Photobiology of Low-Power Laser Effects. **Health Physics**, v. 56, n. 5, p. 691-704, 1989.
- KATCHBURIAN, E.; ARANA-CHAVEZ, V. E. **Histologia e Embriologia Oral: Texto, Atlas, Correlações Clínicas**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- KIMURA, Y.; WILDER-SMITH, P.; MATSUMOTO, K. Lasers in endodontics: a review. **International Endodontic Journal**, v. 33, n. 3, p. 173-185, 2000.
- KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A. B.; WILLERSHAUSEN, B.; D'HOEDT, B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, n. 4, p. 353-358, 2003.
- LI, Z.; CAO, L.; FAN, M.; XU, Q. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide or Mineral Trioxide Aggregate: A Meta-analysis. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 9, p. 1412-1417, 2015.
- LONČAR, B.; STIPETIĆ, M. M.; BARIČEVIĆ, M.; RISOVIĆ, D. The effect of low-level laser therapy on salivary glands in patients with xerostomia. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 3, p. 171-175, 2011.
- MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in Ruby. **Nature**, v. 187, p. 493, 1960.
- MARINI, I.; GATTO, M. R.; BONETTI, G. A. Effects of superpulsed low-level laser therapy on temporomandibular joint pain. **The Clinical Journal of Pain**, v. 26, p. 611-616, 2010.
- MATSUI, S.; TSUJIMOTO, Y.; MATSUSHIMA, K. Stimulatory effects of hydroxyl radical generation by Ga-Al-As laser irradiation on mineralization ability of human dental pulp cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 1, p. 27-31, 2007.
- MAZZETTO, M. O.; HOTTA, TH.; PIZZO, R. C. Measurements of jaw movements and TMJ pain intensity in patients treated with GaAlAs laser. **Brazilian Dental Journal**, v. 21, p. 356-360, 2010.
- MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 31-39, 1985.
- MIYATA, H.; GENMA, T.; OHSHIMA, M.; YAMAGUCHI, Y.; HAYASHI, M.; TAKEICHI, O.; OGISO, B.; OTSUKA, K. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation of cultured human dental pulp cells by low-power gallium-aluminium-arsenic laser irradiation. **International Endodontic Journal**, v. 39, n. 3, p. 238-244, 2006.
- MURRAY, P. E.; SMITH, A. J.; WINDSOR, L. J.; MJÖR, I. A. Remaining dentine thickness and human pulp responses. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 1, p. 33-43, 2003.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Guide for the care and use of laboratory animals**. Department of Health and Human Services Publication n. NIH 85-23(1985). Washington, D.C.: Government Printing Office, 1985.

NICOLA, R. A.; JORGETTI, V.; RIGAU, J.; PACHECO, M. T.; DOS REIS, L. M.; ZÂNGARO, R. A. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Medical in Science**. v.18, n. 2, p. 89-94, 2003.

OLIVEIRA SAMPAIO, S. C.; DE C MONTEIRO, J. S.; CANGUSSÚ, M. C.; PIRES SANTOS, G. M.; DOS SANTOS, M. A.; DOS SANTOS, J. N.; PINHEIRO, A. L. Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 3, p. 799-806, 2013.

OLIVEIRA, C. F.; HEBLING, J.; SOUZA, P. P. C.; SACONO, N. T.; LESSA, F. R.; LIZARELLI, R. F. Z.; COSTA, C. A. S. Effect of low-level laser irradiation on odontoblast-like cells. **Laser Physics Letters**, v. 5, n. 9, p. 680-685, 2008.

OMASA, S.; MOTOYOSHI, M.; ARAI, Y.; EJIMA, K.; SHIMIZU, N. Low-level laser therapy enhances the stability of orthodontic mini-implants via bone formation related to BMP-2 expression in a rat model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, p. 255-261, 2012.

ORHAN, K.; AKSOY, U.; CAN-KARABULUT, D. C.; KALENDER, A. Low-level laser therapy of dentin hypersensitivity: a short-term clinical trial. **Lasers in Medical Science**, v. 26, p. 591-598, 2011.

PAVLIC, V. The effects of low-level laser therapy on xerostomia (mouth dryness). **Medicinski Pregled**, v. 65, p. 247–250, 2012.

PEJCIC, A.; KOJOVIC, D.; KESIC, L.; OBRADOVIC, R. The effects of low level laser irradiation on gingival inflammation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, p.69-74, 2010.

PEREIRA, L. B.; CHIMELLO, D. T.; FERREIRA, M. R.; BACHMANN, L.; ROSA, A. L.; BOMBONATO-PRADO, K. F. Low-level laser therapy influences mouse odontoblast-like cell response in vitro. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 4, p. 206-213, 2012.

PINHEIRO, A. L. Advances and perspectives on tissue repair and healing. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 6, p. 833-836, 2009.

PINHEIRO, A. L. B.; BRUGNERA JR, A.; ZANIN, F. A. A. **Aplicação do Laser na Odontologia**. São Paulo: Santos, 2010.

PINHEIRO, A. L.; SOARES, L. G.; ACIOLE, G. T.; CORREIA, N. A.; BARBOSA, A. F.; RAMALHO, L. M.; DOS SANTOS, J. N. Light microscopic description of the effects of laser phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration in a rodent model. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 98, n. 2, p. 212-221, 2011.

POGGIO, C.; BELTRAMI, R.; COLOMBO, M.; CECI, M.; DAGNA, A.; CHIESA, M. In vitro antibacterial activity of different pulp capping materials. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 7, n. 5, p. 584-588, 2015.

PRETEL, H.; OLIVEIRA, J.A.; LIZARELLI, R. F. Z.; RAMALHO, L.T.O. Evaluation of dental pulp repair using low level laser therapy (688 nm and 785 nm) morphologic study in capuchin monkeys. **Laser Physics Letters**, v. 6, n. 2, 149-158, 2009.

PUGLIESE, L. S.; MEDRADO, A. P.; REIS, S. R.; ANDRADE, Z. D. E. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 307-313, 2003.

RIZZI, M.; MIGLIARIO, M.; ROCCHETTI, V.; TONELLO, S.; RENÒ, F. Pre-odontoblast proliferation induced by near-infrared laser stimulation. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 5, p. 794-800, 2016.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**, Methuen, London, 1959.

SANTOS, N. R.; DOS SANTOS, J. N.; DOS REIS, J. A. JR.; OLIVEIRA, P. C.; DE SOUSA, A. P.; DE CARVALHO, C. M.; SOARES, L. G.; MARQUES, A. M.; PINHEIRO, A. L. Influence of the use of laser phototherapy (lambda660 or 790 nm) on the survival of cutaneous flaps on diabetic rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 4, p. 483-498, 2010.

SHIGETANI, Y.; OHKURA, N.; YOSHIBA, K.; OHSHIMA, H.; HOSOYA, A.; YOSHIBA, N.; OKIJI, T. GaAlAs laser-induced pulp mineralization involves dentin matrix protein 1 and osteopontin expression. **Oral Diseases**, v. 22, n. 5, p. 399-405, 2016.

SHIGETANI, Y.; SASA, N.; SUZUKI, H.; OKIJI, T.; OHSHIMA, H. GaAlAs laser irradiation induces active tertiary dentin formation after pulpal apoptosis and cell proliferation in rat molars. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 8, p. 1086-1091, 2011.

SILVA, A. C.; FARIA, M. R.; FONTES, A.; CAMPOS, M. S.; CAVALCANTI, B. N. Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. **Journal of Applied Oral Science**, v. 17, n. 5, p. 527-532, 2009.

SKINNER, S. M.; GAGE, J. P.; WILCE, P. A.; SHAW, R. M. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. **Australian Dental Journal**, v. 41, n. 3, p. 188-192, 1996.

SMITH, A. J.; CASSIDY, N.; PERRY, H.; BÈGUE-KIRN, C.; RUCH, J. V.; LESOT, H. Reactionary dentinogenesis. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 39, n. 1, p. 273-280, 1995.

SODEK, J.; GANSS, B.; MCKEE, M. D. Osteopontin. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 11, n. 3, p. 279-303, 2000.

TANZI, E. L.; LUPTON, J. R.; ALSTER, T. S. Lasers in dermatology: four decades of progress. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, n. 1, p. 1-31, 2003.

TATE, Y.; YOSHIBA, K.; YOSHIBA, N.; IWAKU, M.; OKIJI, T.; OHSHIMA, H. Odontoblast responses to GaAlAs laser irradiation in rat molars: an experimental study using heat-shock protein-25 immunohistochemistry. **European Journal of Oral Sciences**, v. 114, n. 1, p. 50-57, 2006.

TRAN-HUNG, L.; LAURENT, P.; CAMPS, J.; ABOUT, I. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 1, p. 9-13, 2008.

TZIAFAS, D. Mechanisms controlling secondary initiation of dentinogenesis: a review. **International Endodontic Journal**, v. 27, n. 2, p. 61-74, 1994.

TZIAFAS, D.; SMITH, A. J.; LESOT, H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. **Journal of Dentistry**, v. 28, n. 2, p. 77-92, 2000.

UTSUNOMIYA, T. A histopathological study of the effects of low-power laser irradiation on wound healing of exposed dental pulp tissues in dogs, with special reference to lectins and collagens. **Journal of Endodontics**, v. 24, n. 3, p. 187-193, 1998.

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

7 CAPÍTULO

Efeito da fototerapia (780 nm) sobre o complexo dentina-polpa em um modelo de luxação extrusiva de incisivos de ratos

Dandara Andrade de Santana¹; Gabriela Ferraz Fonseca²; Luciana Maria Pedreira Ramalho³; Tânia Tavares Rodriguez⁴; Márcio Cajazeira Aguiar⁵

¹ Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, BA, Brasil

² Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

³ Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

⁴ Departamento de Biorregulação, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

⁵ Laboratório de Biologia Estrutural e Molecular da Região Orofacial, Departamento de Biomorfologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

Correspondência

Dr. Márcio Cajazeira Aguiar

Departamento de Biomorfologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

Instituto de Ciências da Saúde - Avenida Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela. Salvador, BA, Brasil. CEP 40110-902.

E-mail: mcaguiar@ufba.br

Telefone: +55 71 3283-8888

Resumo

O reparo pulpar é um fenômeno no qual o complexo dentina-polpa responde à injúria por meio da deposição de dentina terciária. A fim de regenerar a polpa dentária, muitas estratégias têm sido desenvolvidas como a fototerapia. No reparo pulpar, há dúvidas se a laserterapia pode preservar os odontoblastos primários ou estimular a formação de uma matriz de dentina mais organizada quando a polpa dentária é danificada. O objetivo do presente estudo foi examinar o efeito da fototerapia a laser ($\lambda 780$ nm) sobre a vascularização, inflamação, densidade da camada de odontoblastos primários e formação de dentina reacional e reparativa na polpa dentária do incisivo de rato submetido à extrusão. Os incisivos superiores foram extruídos em 3 mm e depois reposicionados em seus alvéolos originais, seguindo da irradiação laser da mucosa palatina ($\lambda = 780$ nm, P = 70 mW, CW, 4,2 J/cm², 60 s) a cada 48 h. Incisivos não traumatizados e/ou não irradiados foram utilizados como controle. Aos 8 e 30 dias após a cirurgia, os incisivos foram processados para análise histológica e histomorfométrica em microscopia de luz. A análise morfológica não revelou diferenças na vascularização entre os grupos, mas mostrou inflamação discreta em alguns espécimes não irradiados e injuriados, o que correlacionou com uma dentina reparativa mais irregular. A avaliação histomorfométrica não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle e laser para densidade de odontoblastos primários e espessura da dentina terciária ($p > 0,05$). O presente estudo mostrou que o laser GaAlAs induziu pequenas alterações no complexo dentina-polpa, com a formação de matriz dentinária mais regular nas polpas dentárias irradiadas.

Palavras-chave: Polpa dentária. Odontoblasto. Dentina terciária. Laser. Terapia com luz de baixa intensidade.

ABSTRACT

Pulp repair is a phenomenon by which the dentin-pulp complex may respond to injury through the deposition of tertiary dentin. In order to regenerate the dental pulp, many strategies have been developed as phototherapy. In the pulp repair, we do not know if GaAlAs laser preserves the primary odontoblasts and stimulate the formation of a more organized dentin matrix when dental pulp is mechanically damaged. The aim of the present study was to examine the effect of laser phototherapy ($\lambda 780$ nm) on vascularization, inflammation, density of the primary odontoblast layer and formation of reactionary and reparative dentin in the dental pulp by provoking extrusion of the rat incisor. The upper incisors were extruded 3 mm and then repositioned into their original sockets followed by a laser irradiation of the palatal mucosa ($\lambda = 780$ nm; P = 70 mW; CW; 4,2 J/cm²; 60 s) every 48 h. Non-traumatized and/or non-irradiated incisors were used as the controls. At 8 and 30 days after surgery, incisors were processed for histological and histomorphometric analysis. Morphological analysis revealed no differences in vascularization between groups, but showed discrete inflammation in some non-irradiated and injured specimens, which correlated with a more irregular reparative dentin. The histomorphometric evaluation did not show statistically significant differences between the control and laser groups for primary odontoblast density and tertiary dentin thickness ($p > 0.05$). The present findings revealed that the GaAlAs laser induced small changes on dentin-pulp complex, with more regular dentin matrix in the irradiated dental pulp.

Keywords: Dental pulp. Odontoblast. Tertiary dentin. Laser. Low-level light therapy.

INTRODUÇÃO

O reparo pulpar é um fenômeno no qual o complexo dentina-polpa responde à injúria por meio da deposição da dentina terciária em regiões específicas da interface dentina-polpa. Existem dois tipos de dentina terciária. A dentina reacional é secretada por odontoblastos primários em resposta a um estímulo apropriado. A dentina reparativa é formada pelas células *odontoblast-like*, originadas de células da polpa dentária após a destruição dos odontoblastos primários [1]. Os túbulos da dentina reacional continuam com os da dentina secundária, enquanto a dentina reparativa exibe matriz irregular e atubular, muitas vezes, exibindo células aprisionadas [2, 3]. Sua matriz está mais próxima do osso primário do que da dentina primária, especialmente em relação ao seu conteúdo e distribuição de proteínas não colágenas [4].

A resposta inflamatória da pulpar está relacionada à intensidade e duração do estímulo, à idade do dente e à eficiência do selamento cavitário [3, 5]. Se o processo inflamatório progride, pode desenvolver pulpite irreversível e rapidamente resultar em necrose pulpar. Uma adequada terapia de polpa vital deve ser estabelecida na tentativa de recuperar completamente o complexo dentina-polpa por meio da deposição de matriz de dentina secretada por odontoblastos primários, pois não há material artificial que proporcione proteção semelhante à fornecida pela dentina. Idealmente, o objetivo final da terapia pulpar nessas situações é proteger os odontoblastos primários remanescentes [6].

A fim de regenerar e revascularizar a polpa dentária, novas estratégias terapêuticas clínicas tem sido desenvolvidas. Uma estratégia que tem sido investigada na Odontologia é a terapia laser de baixa intensidade (LBI). O LBI tem sido utilizado para promover a cicatrização de feridas e reparo tecidual e aliviar a inflamação, edema e dor [7]. No entanto, sua aplicação na região maxilofacial compreende basicamente o manejo da dor crônica e de lesões de tecidos moles [8]. No complexo dentina-polpa, os estudos *in vivo* sobre o uso do LBI têm sido mais limitados e não estão bem documentados em comparação com outras especialidades. Em geral, esses estudos sugerem que o LBI atua no reparo pulpar, promovendo a formação da dentina terciária, que varia no aspecto e nas células relacionadas [9-12], induzindo um aumento da produção de RNAm para DMP1 e osteopontina [11] e reduzindo a inflamação. Foi observado um efeito positivo do LBI sobre o potencial secretor das células odontoblásticas, mas pouco se sabe sobre o seu efeito na preservação destas células após injúria. Por vezes, os estudos mostraram matriz irregular secretada por células da polpa dentária recém-diferenciadas, muitas vezes, levando à formação de tecido semelhante ao osso, que não é adequado para o reparo pulpar [10, 12]. O efeito do laser de baixa intensidade no complexo dentina-polpa permanece escasso e precisa ser estudado, pois a fotobiomodulação é um mecanismo não invasivo, não farmacológico e econômico, sendo uma boa opção terapêutica para distúrbios bucais e dentários.

Entre os lasers de baixa intensidade disponíveis, o laser de arseneto de gálio e alumínio (GaAIs) tem sido estudado pela sua capacidade de promover ou modificar as respostas da polpa dentária à injúria [13,14]. O laser GaAIs promove a secreção de fibrilas de colágeno mais organizadas pelos odontoblastos primários [6], reduz a inflamação e estimula a formação de dentina terciária [9, 10, 12]. No entanto, seus efeitos nem sempre são favoráveis. Os efeitos adversos podem estar relacionados ao modelo experimental ou aos parâmetros utilizados na fotobiomodulação que podem danificar a polpa dentária. Alguns estudos relataram destruição de odontoblastos primários com formação irregular de dentina em molares saudáveis irradiados com laser GaAIs [11,15]. Portanto, estudos adicionais sobre o efeito do laser GaAIs no complexo dentina-polpa são necessários,

exigindo modelos padronizados que avaliem os benefícios da fotobiomodulação isolada sobre células da polpa dentária injuriada, particularmente se o tipo e a estrutura da dentina terciária são avaliados.

Recentemente foi relatado que os incisivos de rato injuriados por luxação extrusiva exibiram extensas áreas de dentina reacional e reparativa, constituindo num modelo experimental adequado para a análise do efeito do laser GaAlAs nos odontoblastos primários e na secreção e estrutura da dentina terciária [4, 16]. Este modelo pode avaliar o comportamento do complexo dentina-polpa na ausência de exposição pulpar e sem a interferência de produtos oriundos do material restaurador ou das bactérias. Além disso, pode-se também avaliar a quantidade de dentina reacional e reparativa formada após a agressão, que pode estar relacionada à intensidade da injúria e à capacidade de recuperação do complexo dentina-polpa.

Sabe-se que o laser de GaAlAs estimula respostas celulares a fim promover a cicatrização tecidual e reduzir a inflamação. Entretanto, não sabemos se o laser GaAlAs pode preservar os odontoblastos primários e estimular a formação de uma matriz dentinária mais organizada, quando a polpa dentária é mecanicamente traumatizada. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do laser GaAlAs na vascularização, inflamação, densidade da camada de odontoblastos primários e formação de dentina reacional e reparativa em polpa dentária de incisivo de rato submetido à extrusão por meio de análises histológica e histomorfométrica .

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com os princípios de cuidado aos animais de laboratório (Publicação NIH 85-23, 1985) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, Brasil (Protocolo nº 054/2014).

Trinta e três ratos *Wistar* machos com peso entre 200 e 250g foram divididos aleatoriamente em grupos. Um grupo foi constituído por dentes submetidos à extrusão e irradiados com laser. Outro grupo compreendeu dentes não traumatizados e tratados com laser. Os dentes não irradiados foram divididos em outros dois grupos (extrusão e não extrusão). Todos os grupos foram ainda subdivididos de acordo com o período de eutanásia. Com base nos princípios de utilização de animais na investigação científica (Os três Rs), os subgrupos constituídos por dentes não irradiados e não traumatizados (8 e 30 dias) foram constituídos pelos mesmos animais, uma vez que não foram submetidos ao trauma ou irradiados com laser [17]. Dois dentes (um dente de cada grupo) foram perdidos em virtude problemas causados pelo processamento histológico ou técnica cirúrgica (Tabela 1).

Tabela 1 Distribuição do número de animais em diferentes períodos de tempo experimental, de acordo com a irradiação laser e a luxação extrusiva.

Período de tempo	Grupos			
	Controle		Laser	
	Sem extrusão	Extrusão	Sem extrusão	Extrusão
8 dias		n= 5	n= 5	n= 4
30 dias	n= 4	n= 5	n= 5	n= 5

Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma combinação de cloridrato de cetamina (Cetamin®, Syntec, Santana de Parnaíba, SP) e xilazina (Xilazin®, Syntec, Santana de Parnaíba, SP) em concentrações de 10 e 1,4 mg por 100 g de peso corporal, respectivamente. Após assepsia com solução alcoólica de iodo, 2 mm da borda incisal foram desgastados com uma broca cilíndrica diamantada. Foi realizada sindesmotomia em torno dos incisivos superiores direito com instrumental Holleback 3S modificado (Golgran, SP), seguido da extrusão de 3 mm com fórceps pediátrico adaptado nº 151 (Golgran, SP). Estes dentes foram cuidadosamente reposicionados às suas posições originais. O comprimento da borda incisal desgastada e a quantidade de deslocamento dos dentes durante a extrusão foram medidos com uma régua endodôntica milimetrada. Os ratos foram alimentados com Nuvital® (Nuvital®, Curitiba, PR, Brasil) e água *ad libitum*. Os ratos portadores dos incisivos luxados foram mantidos com ração moída por 8 dias após o procedimento cirúrgico.

Fototerapia

Para realizar a fototerapia, os animais foram anestesiados com a mesma substância utilizada para a indução da luxação extrusiva, aplicando metade da dose inicial, uma vez que este procedimento não foi invasivo e exigiu um tempo mais curto. A fototerapia foi realizada com laser diodo GaAlAs (Twin Flex®, MM Optics, São Carlos, SP), de acordo com os parâmetros mostrados na Tabela 2. A fototerapia foi iniciada imediatamente após o trauma extrusivo (dia 1) e repetiu-se em intervalos de 48 horas durante 7 ou 15 dias, totalizando 4 e 8 sessões no período experimental de 8 dias e 30 dias, respectivamente (Figura 1). O tempo de exposição foi de 60 s, aplicando-se de forma pontual e perpendicular à superfície da mucosa mastigatória palatina do incisivo superior direito.

Tabela 2 Resumo dos parâmetros do laser utilizados no estudo.

Parâmetros	Laser
Comprimento de onda (nm)	780
Densidade de energia (por sessão) (J/cm ²)	4.2
Densidade de energia (4 sessões) (J/cm ²)	16.8
Densidade de energia (8 sessões) (J/cm ²)	33.6
Potência (mW)	70
Área irradiada (cm ²)	1
Tamanho do spot (cm ²)	0.04
Tempo de exposição (por sessão) (s)	60

Preparação tecidual

Oito ou trinta dias após o procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados. Imediatamente, as hemimaxilas contendo os incisivos maxilares direitos foram removidas e colocadas em fixador contendo 4% de formaldeído a pH 7,2 em tampão PBS 0,1 M. Após a remoção de todos os tecidos moles, as hemimaxilas direitas

foram imersas num béquer contendo 40 mL de fixador   temperatura ambiente, o qual foi posteriormente colocado num recipiente de vidro maior cheio de gelo e imediatamente inserido dentro de um forno de micro-ondas (PMS12N2). A seguir, os espécimes foram irradiados por três períodos de 5 min com a temperatura programada para o máximo de 36  C em um micro-ondas ajustado para 60% de potência. Após a irradia o, as amostras foram transferidas e mantidas *overnight* em fixador fresco a 4  C. Então, foram lavadas em tampão PBS 0,1 M, pH 7,2, durante 60 minutos.

Em seguida, todas as hemimaxilas foram descalcificadas numa soluço aquosa de 4,13% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A soluço descalcificante foi trocada a cada 2 dias. Após descalcifica o, as hemimaxilas foram lavadas em tampão PBS, pH 7,2.

Processamento histológico

Após descalcifica o e lavagem, as amostras foram desidratadas em concentra es crescentes de etanol e incluídas em parafina. Os cortes semi-seriados (5  m de espessura) foram cortados no plano sagital, isto  , paralelos ao eixo longitudinal do dente, permitindo a padroniza o das amostras para estudo histomorfométrico. Em seguida, as sec es foram coradas com hematoxilina e eosina (HE).

Análises histológicas

A análise morfológica descritiva das sec es foi realizada em microscópio óptico (BX-51, Olympus , Japão) com uma câmera acoplada, conectada a um computador por um observador cego e compreendeu apenas a interface dentina-polpa localizada entre 400  m e 900  m da extremidade apical do incisivo superior. Descreveram-se as características da matriz dentinária extracelular e células relacionadas   interface dentina-polpa ao longo dos dois períodos pós-trauma, observando-se a presença de inflama o, vasculariza o, espessura e tipo de dentina terciária e irradia o laser.

As imagens das sec es histológicas foram capturadas pelo *software Analysis Get It* através de um sistema formado por uma câmera digital (DP71, Olympus , Japão) e um microscópio de luz.

Análises histomorfométricas - Densidade da camada de odontoblastos primários e espessura da dentina terciária

Na análise histomorfométrica dos dentes não traumatizados, a região capturada compreendeu uma porão localizada a 400  m da extremidade apical do incisivo. Nos dentes injuriados, a área capturada compreendeu uma porão localizada a 400  m da extremidade apical da linha cálcio-traumática. A linha cálcio-traumática   uma linha basofílica entre a dentina formada antes da injúria pulpar e a dentina terciária.

Três sec es de HE da região mais central da polpa dentária foram selecionadas, considerando a sua representatividade e a ausência de artefatos. Para cada grupo foram capturadas imagens de interface dentina-polpa com 100 x de amplia o. A contagem de células foi medida numa área de 0,3 mm² definida pelo *software CorelDraw  Graphics Suite X7*. A densidade celular foi obtida após conversão da quantidade de odontoblastos primários em número de células por unidade de área (células / mm²). Todas as sec es foram analisadas por dois examinadores cegos e calibrados.

Durante a contagem celular, o reconhecimento da camada de odontoblastos primários foi baseado na sua localiza o da polpa dentária (os odontoblastos primários são originalmente as células situadas entre a matriz

dentínaria e o tecido pulpar) e sua morfologia celular. Apenas as células intactas apresentando um núcleo claramente identificável foram incluídas no estudo. Morfologicamente, os odontoblastos primários são células colunares polarizadas com núcleos excêntricos e processos celulares longos. As células cúbicas localizadas perto da matriz da dentina foram excluídas.

A espessura da dentina terciária depositada após o trauma extrusivo foi estimada histomorfometricamente por dois observadores independentes nas mesmas imagens capturadas para a contagem dos odontoblastos primários.

A medição da espessura da dentina terciária foi realizada com o *software CorelDraw® Graphics Suite X7*, traçando nas imagens digitais uma linha perpendicular entre a linha cálcio-traumática e a interface dentina-polpa. O comprimento da linha em mm foi considerado como a espessura da dentina terciária. Em seguida, a espessura da dentina terciária foi convertida em micrômetros (μm).

Para a espessura da dentina terciária, o critério histomorfométrico foi a diferença estrutural entre dentina fisiológica e dentina terciária (reacional e reparativa) separadas pela linha cálcio-traumática. A linha cálcio-traumática foi considerada como uma linha clara que marcou o momento da aplicação do trauma, separando as matrizes da dentina fisiológica e da dentina terciária. A matriz fisiológica da dentina foi caracterizada pela sua aparência tubular regular, associada aos odontoblastos primários. A matriz dentínaria reacional foi similar à dentina fisiológica, mas apresentando túbulos dentinários mais irregulares, associados aos odontoblastos primários resistentes à injúria [1]. Considerou-se como dentina reparativa aquela secretada por células *odontoblast-like* após o desaparecimento de odontoblastos primários. Apresentava uma matriz desorganizada e distrófica, sem túbulos dentinários, por vezes, mostrando células aprisionadas [2,3].

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando SPSS v. 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). A análise da variância intergrupo foi determinada com o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*. O teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para comparar separadamente dois grupos independentes, enquanto as diferenças dentro do mesmo grupo para o período de tempo foram analisadas com o teste de *Wilcoxon*. Os dados foram descritos utilizando mediana e intervalo interquartil (IQRs 25-75) e diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

RESULTADOS

Achados Histológicos

Como o incisivo de rato erupciona continuamente e as células na sua extremidade apical proliferam e se diferenciam ao longo da vida, não há dentina primária e secundária no incisivo de rato, apenas uma dentina fisiológica. Como consequência, dentina fisiológica, reacional e reparativa são os termos utilizados no presente estudo para os tipos de dentina observados no incisivo de rato, a fim de compará-los com os tipos correspondentes nos dentes humanos. Os incisivos de rato injuriados pela luxação extrusiva exibiram extensa área de dentina reacional, mas pequena quantidade de dentina reparativa. Embora vasos sanguíneos dilatados e algumas alterações celulares pudessem ser observados, não foram detectadas áreas com necrose ou infecção na região central da polpa dentária. As características da matriz dentínaria extracelular e células relacionadas à interface dentina-polpa para cada grupo e ao longo dos vários períodos pós-trauma foram descritas a seguir.

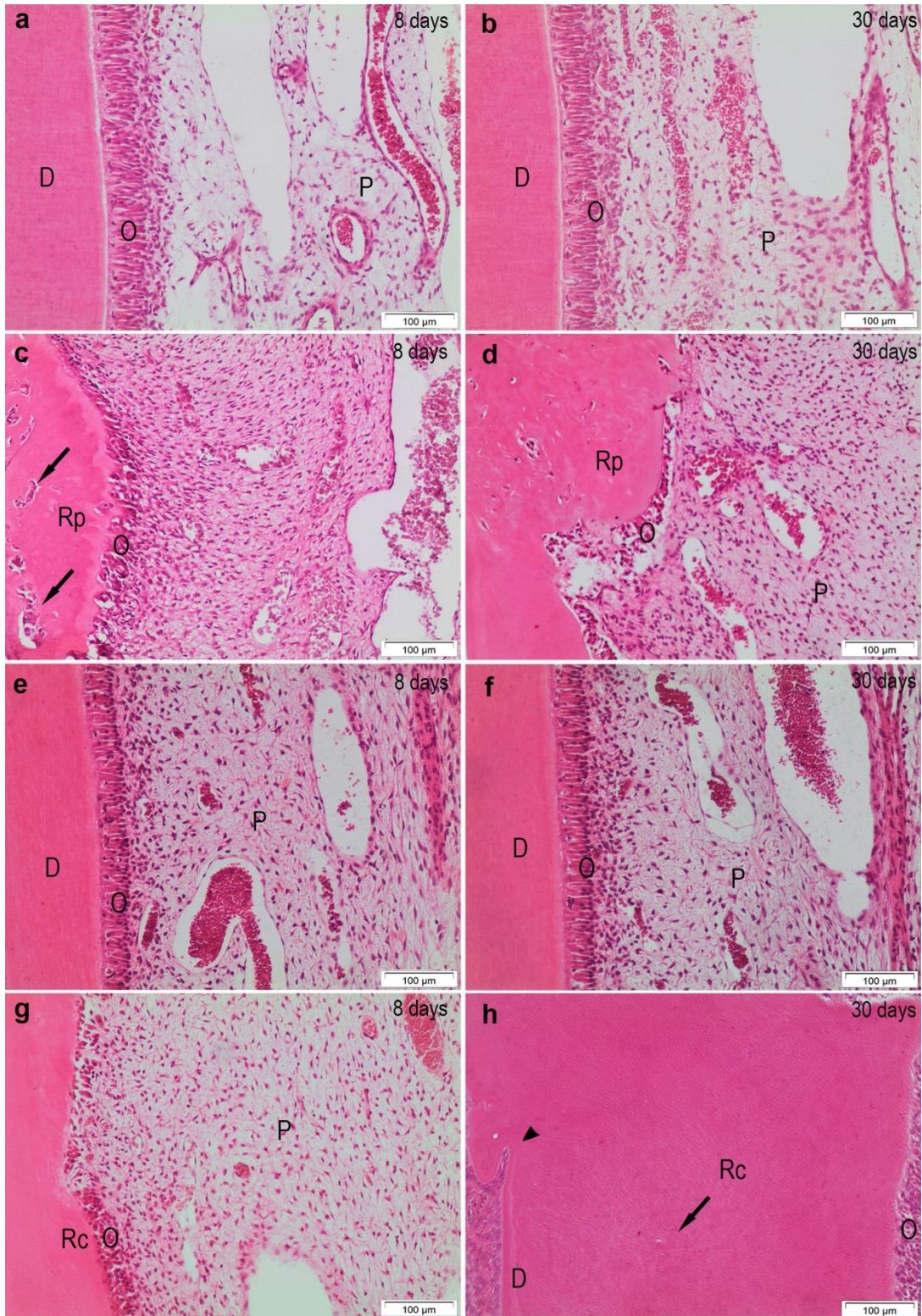
Nas amostras não traumatizadas e não irradiadas, nos dois períodos de tempo (8 e 30 dias), a polpa dentária apresentou aspecto normal, muito celularizada e vascularizada. Não houve inflamação. Na interface dentina-polpa, a matriz dentinária regular (dentina fisiológica) foi associada à camada pseudestratificada de odontoblastos primários (Fig. 1a e 1b).

Nos incisivos luxados e não irradiados, 8 dias após o trauma, a polpa dentária era muito celular, com muitos vasos sanguíneos dilatados. Em todos os espécimes, a interface dentina-polpa mais apical exibiu células cúbicas ou mais curtas revestidas de matriz de dentina atubular que correspondia à dentina reparativa. Na interface dentina-polpa relacionada a um número reduzido de odontoblastos primários, observou-se o início da formação da dentina reacional. Um infiltrado inflamatório crônico difuso foi observado em algumas amostras. Estes espécimes mostraram uma dentina reparativa com célula aprisionada em sua matriz muito irregular, sem evidência de dentina reacional (Fig. 1c). Trinta dias após a luxação, a polpa dentária apresentava aspecto normal, muitas células e vasos sanguíneos. Alguns espécimes apresentavam alterações degenerativas da polpa, celularidade reduzida e deposição de matriz semelhante ao osso primário. Sua interface dentina-polpa apical estava revestida por camada espessa e irregular de matriz dentinária reparativa, contendo células aprisionadas (Figura 1d). Nos demais espécimes, grande parte das interfaces estava revestida por matriz de dentina reacional. A interface entre dentina fisiológica e dentina reacional estava delimitada pela linha cálcio-traumática.

Nos dentes não traumatizados e tratados com laser, 8 e 30 dias após a cirurgia, a polpa dentária exibiu tecido conjuntivo bem celularizado e vascularizado. Os odontoblastos primários formavam uma camada pseudoestratificada que revestia áreas de dentina tubular que correspondiam à dentina fisiológica. A matriz da dentina terciária não foi observada neste grupo (Fig. 1e e 1f).

Nos dentes submetidos à extrusão e irradiados com laser, 8 dias após a cirurgia, a polpa dentária exibiu aspecto saudável, muito celularizada, vascularizada e sem sinais de inflamação. A interface dentina-polpa mais apical mostrou dentina reacional em alguns espécimes, enquanto dois espécimes apresentaram uma camada muito fina de matriz dentinária reparativa revestida por células *odontoblast-like* recém-diferenciadas. Em uma amostra, a matriz dentinária reparativa estendeu-se por toda a extensão da interface dentina-polpa. Nos demais espécimes, a interface dentina-polpa coronária apresentou dentina fisiológica ou matriz dentinária reacional com um pequeno desvio dos túbulos dentinários (Fig. 1g). Trinta dias após a extrusão, os espécimes deste grupo apresentaram polpa dentária celularizada e vascularizada. Não havia sinal de inflamação. A matriz de dentina reacional tornou-se muito espessa (Fig. 1h). Uma linha intensamente corada foi observada entre a dentina fisiológica e dentina reacional (linha cálcio-traumática). Células *odontoblast-like* e matriz dentinária reparativa foram achados raros nesses espécimes.

FIG. 1 Fotomicrografias mostrando várias regiões da interface dentina-polpa de incisivos de ratos nos grupos não irradiados (A, B, C e D) e irradiados (E, F, G e H) 8 ou 30 dias após o procedimento cirúrgico. (A e B) A polpa dentária normal e a dentina fisiológica associada à camada pseudestratificada de odontoblastos primários são observadas em espécimes não irradiados e não traumatizados. Nota-se que os incisivos de ratos saudáveis apresentam originalmente um tecido pulpar bem vascularizado. (C) Região de dentes não irradiados e traumatizados 8 dias após a extrusão em que uma matriz de dentina reparativa pode ser identificada. Observar muitas células aprisionadas em sua matriz (setas) (D) A interface dentina-polpa de dentes não irradiados e traumatizados 30 dias após extrusão mostra uma camada mais espessa de dentina reparativa. Observar que o aspecto tubular regular típico da dentina está ausente. (E e F) Áreas de dentina fisiológica em incisivos irradiados e não traumatizados 8 ou 30 dias após a cirurgia. A polpa dentária é vascularizada, exibindo uma camada odontoblástica bem organizada. (G) A matriz dentinária reacional é observada na interface dentina-polpa dos dentes irradiados e traumatizados 8 dias após a extrusão. Observar os aglomerados de células pulpares em estreita relação com a superfície de dentina exposta em algumas áreas. (H) A matriz mais espessa de dentina reacional é observada sob a dentina fisiológica em incisivos irradiados e traumatizados 30 dias após a extrusão. A zona da dentina reacional é claramente distinguível da dentina fisiológica, pois a primeira tem um número reduzido de túbulos e há uma ligeira alteração na orientação tubular em relação à dentina fisiológica (seta). A extremidade apical da linha cálcio-traumática pode ser observada entre os dois tipos de dentina (ponta de flecha). D, dentina fisiológica; Rc, dentina reacional; Rp, dentina reparativa; O, odontoblastos; P, polpa dentária. Coloração hematoxilina e eosina.



Análise Morfométrica

A comparação intergrupos evidenciou algumas diferenças para a densidade de odontoblastos primários e espessura da dentina terciária, sendo alguns resultados estatisticamente significantes. Nas amostras não traumatizadas, os valores de espessura da dentina foram iguais a 0, pois estes grupos não produziram dentina terciária.

A análise histomorfométrica mostrou que o valor absoluto da densidade de odontoblastos primários foi maior em polpas dentárias irradiadas com laser, quando comparado com os grupos não irradiados. Entretanto, não houve diferenças estatisticamente significantes entre esses grupos ($p > 0,05$). Nos dois períodos de tempo, a polpa dentária irradiada com laser não apresentou espessura dentinária significativamente maior do que aquela dos grupos não irradiados ($p > 0,05$, Tabela 3).

Tabela 3 Densidade da camada de odontoblastos primários (cels/mm²) e espessura de dentina terciária (µm) de acordo com o tipo de tratamento.

Grupos	Parâmetros	Controle	Laser	Valor de p^*
Sem extrusão (8 dias)	Odontoblastos	152 (141-212)	210 (200-230)	0.142
	Dentina	0	0	-
Extrusão (8 dias)	Odontoblastos	23 (8-54)	98 (5-206)	0.624
	Dentina	73 (34-90)	74 (55-93)	0.624
Sem extrusão (30 dias)	Dentina	0	0	-
	Extrusão (30 dias)	Dentina	293 (214-370)	289 (262-449)

* Teste de Mann-Whitney.

^a Os valores são medianas e intervalos interquartis (25-75%).

O estudo comparativo entre os períodos de tempo mostrou aumento da espessura da dentina terciária nos dentes traumatizados (irradiados e não irradiados) 30 dias após a extrusão. No entanto, apenas as polpas dentárias traumatizadas e não irradiadas apresentaram maior deposição da matriz de dentina terciária estatisticamente significante ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significante entre 8 e 30 dias para as amostras traumatizadas e irradiadas em relação à espessura da dentina terciária. Nos incisivos não traumatizados e irradiados, os valores para a espessura da dentina terciária foram iguais entre os dois períodos de tempo (8 e 30 dias), sem diferença estatisticamente significante ($p > 0,05$, Tabela 4).

Tabela 4 Densidade da camada de odontoblastos primários (cels/mm²) e espessura de dentina terciária (µm) de acordo com o período de tempo.

Grupos	Parâmetros	8 dias	30 dias	Valor de p^*
Controle sem extrusão	Odontoblastos	152 (141-212)	-	-
	Dentina	0	0	-
Controle com extrusão	Odontoblastos	23 (8-54)	-	-
	Dentina	73 (34-90)	293 (214-370)	0,043
Laser sem extrusão	Odontoblastos	210 (200-230)	230 (223-250)	0,066
	Dentina	0	0	-
Laser com extrusão	Odontoblastos	98 (5-206)	-	-
	Dentina	74 (55-93)	289 (262-449)	0,068

* Teste de Mann-Whitney.

^a Os valores são medianas e intervalos interquartis (25-75%).

Oito dias após o trauma, todos os incisivos extruídos (irradiados e não irradiados) mostraram uma redução no valor absoluto da densidade da camada de odontoblastos. Contudo, apenas os dentes traumatizados e não irradiados exibiram redução estatisticamente significativa na densidade da camada de odontoblastos, quando comparados com o grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos irradiados (traumatizados e não-traumatizados) em relação à densidade da camada odontoblástica. Todos os incisivos submetidos à extrusão mostraram aumento estatisticamente significativo da dentina terciária, quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$; Tabela 5).

Tabela 5 Densidade da camada de odontoblastos primários (cels/mm²) e espessura de dentina terciária (µm) de acordo com a presença do trauma.

Grupos	Parâmetros	Sem extrusão	Extrusão	Valor de p*
Controle (8 dias)	Odontoblastos	152 (141-212)	23 (8-54)	0,014
	Dentina	0	73 (34-90)	0,014
Controle (30 dias)	Dentina	0	293 (214-370)	0,014
Laser (8 dias)	Odontoblastos	210 (200-230)	98 (5-206)	0,141
	Dentina	0	74 (55-93)	0,014
Laser (30 dias)	Dentina	0	289 (262-449)	0,009

* Teste de Mann-Whitney.

^a Os valores são mediana e intervalos interquartis (25-75%).

DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que o modelo de trauma extrusivo sobre o incisivo superior de rato afeta a polpa dentária, estimulando a produção de uma grande quantidade de dentina reacional, mas pequena quantidade de matriz dentinária reparativa. O laser GaAIs apenas influenciou ligeiramente o reparo pulpar após a injúria mecânica experimental, pois a análise histomorfométrica não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e laser para a densidade da camada odontoblástica e a espessura da dentina terciária. No entanto, a análise morfológica descritiva mostrou uma maior frequência de dentina reparativa e alterações degenerativas nas polpas dentárias injuriadas e não irradiadas.

O efeito do laser GaAIs sobre o complexo dentina-polpa tem sido estudado por meio da realização de preparos cavitários seguidos da aplicação de agentes capeadores e restauradores nas cavidades [6, 9, 10, 14]. Em nosso estudo, optou-se por um modelo de injúria dentária traumática sem exposição pulpar, pois estudos anteriores demonstraram que o trauma extrusivo nos incisivos superiores pode constituir num modelo experimental adequado para a análise de aspectos relacionados à formação e estrutura da dentina terciária [16]. Nestes estudos, as alterações mais relevantes nos odontoblastos primários e na dentinogênese terciária foram observadas nos períodos de 8 e 30 dias após um trauma extrusivo, constituindo-se nos períodos de tempo mais adequados para o estudo da laserterapia no reparo pulpar. As áreas avaliadas foram restritas à porção localizada entre 400 e 900 µm da extremidade apical. A extremidade mais apical não foi examinada porque é uma área odontogênica e o tecido subjacente à dentina em formação é mais parecido com uma papila dentária do que com uma polpa dentária. A extremidade incisal também não foi avaliada porque a matriz dentinária, muitas vezes irregular, é depositada em resposta ao desgaste contínuo causado pela mastigação.

A escolha do laser de baixa intensidade (780 nm) foi baseada em trabalhos anteriores [19, 20] e porque os comprimentos de onda de 780-950 nm têm sido usados para tratar camadas mais profundas de tecido [7]. A densidade de energia de 4,2 J/cm² baseou-se na evidência de que baixas densidades de energia (3 ou 5 J/cm²) mostram um melhor efeito sobre os tecidos [21]. Para evitar um acúmulo de doses de LBI, que poderia resultar na bioinibição, a terapia com laser foi conduzida com uma série de 4 ou 8 sessões, com intervalo mínimo de 48 horas entre os tratamentos.

No presente estudo, a vascularização do tecido pulpar foi avaliada em todos os espécimes, pois um dos possíveis efeitos positivos do LBI é estimular a angiogênese [22]. A angiogênese é essencial para a formação da dentina terciária durante a recuperação da polpa dentária [23]. A análise morfológica revelou que todas as polpas dentárias apresentaram suprimento vascular adequado, embora alguns espécimes traumatizados e não irradiados tenham mostrado vasos dilatados, pois suas polpas dentárias exibiram pequenas alterações degenerativas. Nos outros espécimes não houve diferença entre os grupos na vascularização, sugerindo que o LBI não melhorou a angiogênese pulpar após a extrusão. Em nosso estudo, o efeito potencialmente angiogênico do laser pode ter sido mascarado pelo fato de que o incisivo de rato mostra originalmente um ápice aberto e uma polpa dentária muito vascularizada. A presença de um tecido pulpar bem vascularizado em todos os grupos também pode explicar o fato de todos os espécimes submetidos à extrusão mostrarem uma boa preservação da camada odontoblástica e matriz dentinária espessa, com uma pequena quantidade de secreção de dentina reparativa.

A inflamação e as alterações degenerativas foram observadas somente em espécimes traumatizados e não irradiados. Nestes espécimes, a matriz dentinária reparativa era mais espessa, mais irregular e continha mais células aprisionadas, quando comparada com a matriz dentinária reparativa desenvolvida em polpas dentárias não inflamadas. Em contraste, os incisivos injuriados e irradiados revelaram uma matriz dentinária semelhante à dentina reacional com padrão tubular regular e sem inclusões celulares, enquanto a dentina reparativa foi menos comum do que no grupo controle. Como a deposição de dentina reparativa é influenciada pelo grau de inflamação pulpar após lesão tecidual [24], e nenhuma polpa dentária submetida à fotobiomodulação a laser apresentou processo inflamatório, sugere-se que o GaAlAs possa ter regulado a resposta inflamatória após injúria pulpar, evitando a formação de dentina reparativa e contribuindo para a secreção de uma matriz dentinária mais regular.

Entretanto, não houve diferenças significativas na espessura da dentina terciária, quando os incisivos submetidos ao tratamento com laser foram comparados com espécimes não irradiados. Este achado não está de acordo com dois relatos sobre a secreção de dentina terciária induzida pelo laser GaAlAs [10,12]. Pretel *et al.* (2009) mostraram diferenças entre os ratos controle e os espécimes irradiados no sexagésimo dia de tratamento. No entanto, alguns aspectos precisam ser considerados. Neste estudo, a polpa dentária de macacos foi exposta, tratada com hidróxido de cálcio e irradiada com laser 785 nm, com formação de matriz dentinária reparativa por novos odontoblastos derivados de células pulpares. É possível que a ação do laser na polpa dentária possa ter sido maximizada pela exposição pulpar e pelo capeamento pulpar direto com hidróxido de cálcio [10]. Em nosso estudo, a polpa dentária foi mecanicamente injuriada e a maior parte do tecido duro foi composta de dentina reacional. Tate *et al.* (2006), irradiando dentes saudáveis de ratos com laser 810 nm por 180 s com potência variando de 0,5 a 1,5 W, demonstraram a ocorrência de deposição de tecido ósseo na polpa dentária, além da formação de dentina terciária [12]. O tecido ósseo foi mais observado em espécimes irradiados com fototerapia com potência mais alta. Como a presença de tecido ósseo indica severas alterações regressivas e irreversíveis na

polpa dentária, o estímulo à produção de matriz dentinária pelo laser ocorreu por agressão tecidual e, portanto, não se constitui num efeito benéfico da fototerapia no reparo pulpar.

A análise histomorfométrica revelou uma redução na densidade dos odontoblastos primários em polpas dentárias injuriadas por luxação extrusiva, quando comparada com polpas dentárias não traumatizadas, confirmando o potencial do modelo experimental em danificar a camada de odontoblastos. Isto está de acordo com os estudos de Aguiar & Arana (2007) e Aguiar & Arana (2010), mostrando que o trauma extrusivo no incisivo superior de rato afeta a polpa dentária e a camada odontoblástica, além de promover a formação de dentina reacional e reparativa [16].

Os odontoblastos primários desempenham um papel importante na manutenção da integridade dos dentes, pois secretam novas camadas de dentina ao longo da vida. As células *odontoblast-like* derivadas de células pulpares podem também formar matriz de dentina, quando os odontoblastos primários são destruídos. No entanto, sua matriz dentinária é irregular, contendo, muitas vezes, células aprisionadas. Portanto, a melhor terapia é aquela que preserva os odontoblastos primários, estimulando a formação de dentina reacional. Estudos *in vitro* demonstraram que as células odontoblásticas irradiadas com GaAIs apresentam maior quantidade de atividade de fosfatase alcalina (ALP), formam mais nódulos calcificados, mostram maior expressão de colágeno e produzem mais fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), quando comparados com as células não irradiadas [13], mas estudos *in vivo* tem revelado que a irradiação com laser GaAIs de energia mais elevada em dentes íntegros induz alterações irreversíveis nos odontoblastos primários que evoluem para a sua apoptose [12, 15]. Considerando a possibilidade de o laser influenciar a sobrevivência dos odontoblastos primários, nenhum estudo *in vivo* investigou o efeito da irradiação com laser GaAIs sobre a densidade da camada de odontoblastos primários após uma injúria pulpar. Em um estudo anterior, nós mostramos que o odontoblasto primário subjacente à dentina primária apresenta imunomarcagem para a osteopontina (OPN), proteína não colagenosa em tecidos mineralizados, na região de Golgi, nos primeiros períodos de tempo após injúria dentária traumática [4]. A OPN parece estimular fatores de sobrevivência ou ativar mecanismos anti-apoptóticos que previnem a morte celular em várias linhas celulares. A presença intracelular desta proteína pode ser necessária em eventos de sinalização para desencadear a reativação de odontoblastos para secreção da dentina reacional [25- 27]. Tem sido relatado anteriormente que o nível de expressão do RNAm de OPN aumenta significativamente após a irradiação com laser GaAIs, permanecendo em níveis altos nos primeiros dias e depois reduzindo no último período de tempo [11]. Sua presença na região de Golgi dos odontoblastos primários após irradiação sugere que o laser pode estimular mecanismos adaptativos, aumentando a sobrevivência dos odontoblastos primários. Para testar essa hipótese, examinamos a densidade de odontoblastos primários após injúria pulpar. A análise histomorfométrica mostrou maior densidade celular de odontoblastos primários em todos os grupos tratados com laser (polpa injuriada ou não), quando comparados com polpas dentárias não irradiadas. Esses achados parecem indicar uma ação benéfica do laser sobre odontoblastos primários que pode contribuir para a produção de uma dentina mais regular após uma injúria pulpar. No entanto, não houve diferenças estatisticamente significantes entre estes grupos e estudos adicionais com uma amostra maior devem ser realizados para confirmar estes achados.

Embora nossos resultados tenham indicado um potencial benefício do laser GaAIs (780 nm) no complexo dentina-polpa, as diferenças na densidade celular e na espessura da dentina terciária entre espécimes irradiados e não irradiados não foram confirmadas por análise estatística. Além da necessidade de uma amostra maior para demonstrar significância estatística, outras razões podem explicar a falta de evidência estatística.

Uma vez que os lasers de maior comprimento de onda são usados para tratar tecidos mais profundos [28], é possível que o comprimento de onda empregado no estudo não tenha sido capaz de atravessar todos os tecidos (pele, osso, ligamento periodontal e dentina), exercendo uma ação bioquímica limitada sobre a polpa dentária. Outra possibilidade deve ainda ser considerada, a quantidade de energia entregue ao tecido ($4,2 \text{ J/cm}^2$) pode ter sido excessiva ou insuficiente para ter qualquer efeito. De acordo com o conceito básico de estimulação e inibição celular pelo laser, é necessário que a quantidade de energia aplicada seja suficiente para cruzar o limiar que atinge a bioestimulação. Há também a bioinibição quando a energia entregue ao tecido é excessiva [21, 29]. De fato, os espécimes irradiados com maior potência podem danificar a polpa dentária saudável, inclusive os odontoblastos primários, produzindo quantidades variáveis de matriz de dentina reparativa [11, 12, 15]. No presente estudo, a potência não foi excessiva a ponto de danificar o complexo dentina-polpa, pois os dentes não traumatizados e irradiados com laser compartilharam aspecto similar aos dentes não injuriados e não irradiados. Em adição, dentes não traumatizados e irradiados com laser tenderam a possuir uma maior densidade de odontoblastos quando comparados com o seu controle.

O emprego da fototerapia no complexo dentina-polpa tem sido prejudicado, pelo fato da literatura relatar diferentes protocolos e configurações de laser, que podem atuar diferentemente na polpa dentária [12, 30]. No presente estudo, avaliamos se as configurações de laser utilizadas em um estudo anterior poderia ser uma ferramenta benéfica para um reparo pulpar mais favorável em um modelo de injúria pulpar [20]. Nossos resultados parecem promissores, mas precisam ser explorados para confirmar sua eficácia e segurança.

Além disso, pode-se considerar que o modelo experimental não é apropriado para avaliar o reparo pulpar em dentes humanos. Incisivos de roedores exibem crescimento contínuo ao longo da vida. Suas secções transversais em série lembram o desenvolvimento de um germe dentário. Aproximadamente $30 \mu\text{m}$ da extremidade apical, existe uma massa de células epiteliais que são semelhantes às células epiteliais presentes na fase inicial de botão da odontogênese. A fase de capuz aparece em $120\text{-}180 \mu\text{m}$, enquanto que o estágio de campânula é observado próximo a $210\text{-}300 \mu\text{m}$ da extremidade apical [31]. A fim de evitar o estudo em uma região que compartilhara uma aparência semelhante ao germe dentário, nossa análise morfológica foi realizada na interface polpa-dentina localizada entre $400 \mu\text{m}$ e $900 \mu\text{m}$ da extremidade apical do incisivo superior. No entanto, não podemos eliminar a possibilidade de que anormalidades da extremidade apical tenham influenciado o reparo pulpar acima dessa região. Além disso, os incisivos de rato mostram uma vascularização maior, porque têm um ápice muito aberto. Isto pode conferir ao incisivo de rato um poder de reparo pulpar elevado após a injúria, o que não corresponde à realidade fisiológica e clínica dos dentes humanos, mascarando os efeitos potencialmente benéficos do laser de baixa intensidade.

Este foi o primeiro estudo para investigar o uso do laser GaAIs em polpas dentárias não expostas em um modelo de injúria dentária traumática sem contaminação química ou bacteriana. Os resultados apresentados aqui revelaram que o laser GaAIs (780 nm) induziu pequenas alterações no complexo dentina-polpa, sem diferença estatisticamente significativa, porém com matriz dentinária reparativa mais irregular na polpa dentária não irradiada mostrada por análise morfológica descritiva. Assim, nossos resultados indicaram um potencial benefício do uso de lasers no reparo pulpar, mas devem ser interpretados cautelosamente, pois este é um estudo realizado em incisivos de ratos que podem não estar reproduzindo a complexidade dos efeitos observados nos dentes humanos. Nossos achados devem ser confirmados por meio de pesquisas experimentais utilizando lasers

com diferentes parâmetros de irradiação e outros modelos experimentais para confirmar os efeitos potencialmente benéficos do laser de baixa intensidade sobre o complexo dentina-polpa.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Sr. Edilson Amâncio da Silva pela assistência técnica. Este trabalho foi parcialmente apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

CONFLITO DE INTERESSES

Não existem interesses financeiros concorrentes.

REFERÊNCIAS

1. Arana-Chavez VE, Massa LF (2004) Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentin. *Int J Biochem Cell Biol* 36(8):1367–73
2. Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Bègue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H (1995) Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol* 39(1):273–80
3. Tziafas D (1994) Mechanisms controlling secondary initiation of dentinogenesis: a review. *Int Endod J* 27(2):61–74
4. Aguiar MC, Arana-Chavez VE (2007) Ultrastructural and immunocytochemical analyses of osteopontin in reactionary and reparative dentin formed after extrusion of upper rat incisors. *J Anat* 210(4):418–27
5. Mjör IA (2002) Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 7: The exposed pulp. *Quintessence Int* 33(2):113–35
6. Godoy BM, Arana-Chavez VE, Núñez SC, Ribeiro MS (2007) Effects of low-power red laser on dentin-pulp interface after cavity preparation. An ultrastructural study. *Arch Oral Biol* 52(9):899–903
7. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR (2012) The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng* 40(2):516–33
8. Carroll JD, Milward MR, Cooper PR, Hadis M, Palin WM (2014) Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. *Dent Mater* 30(5):465–75
9. Ferreira AN, Silveira L, Genovese WJ, de Araújo VC, Frigo L, de Mesquita RA, Guedes E (2006) Effect of GaAlAs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. *Photomed Laser Surg* 24(3):358–65
10. Pretel H, Oliveira JA, Lizarelli RFZ, Ramalho LTO (2009) Evaluation of dental pulp repair using low level laser therapy (688 nm and 785 nm) morphologic study in capuchin monkeys. *Laser Phys. Lett* 6:149–58
11. Shigetani Y, Ohkura N, Yoshiba K, Ohshima H, Hosoya A, Yoshiba N, Okiji T (2016) GaAlAs laser-induced pulp mineralization involves dentin matrix protein 1 and osteopontin expression. *Oral Dis* 22(5):399–405
12. Tate Y, Yoshiba K, Yoshiba N, Iwaku M, Okiji T, Ohshima H (2006) Odontoblast responses to GaAlAs laser irradiation in rat molars: an experimental study using heat-shock protein-25 immunohistochemistry. *Eur J Oral Sci* 114(1):50–7

13. Pereira LB, Chimello DT, Ferreira MR, Bachmann L, Rosa AL, Bombonato-Prado KF (2012) Low-level laser therapy influences mouse odontoblast-like cell response in vitro. *Photomed Laser Surg* 30(4):206–13
14. Fekrazad R, Seraj B, Ghadimi S, Tamiz P, Mottahary P, Dehghan MM (2015) The effect of low-level laser therapy (810 nm) on root development of immature permanente teeth in dogs. *Lasers Med Sci* 30(4):1251–7
15. Shigetani Y, Sasa N, Suzuki H, Okiji T, Ohshima H (2001) GaAlAs laser irradiation induces active tertiary dentin formation after pulpal apoptosis and cell proliferation in rat molars. *J Endod* 37(8):1086–91
16. Aguiar MC, Arana-Chavez VE (2010) Immunocytochemical detection of dentin matrix protein 1 in experimentally induced reactionary and reparative dentin in rat incisors. *Arch Oral Biol* 55(3):210–4
17. Russell WMS, Burch RL (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*, Methuen, London.
18. Massa LF, Arana-Chavez VE (2000) Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. *Eur J Oral Sci* 108:74–77
19. de Castro IC, Rosa CB, Carvalho CM, Aragão JS, Cangussu MC, Dos Santos JN, Pinheiro AL (2015) Assessment of different energy delivery settings in laser and LED phototherapies in the inflammatory process of rat's TMJ induced by carrageenan. *Lasers Med Sci* 30(8):2105–13
20. de Carvalho FB, Andrade AS, Barbosa AF, Aguiar MC, Cangussu MC, Pinheiro AL, Ramalho LM (2016) Evaluation of laser phototherapy (λ 780 nm) after dental replantation in rats. *Dent Traumatol* 32(6):488–494
21. Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR (2009) Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose response* 7(4):358–383
22. Pretel H, Lizarelli RFZ, Ramalho LTO (2007) Effect of low-level laser therapy on bone repair: Histological study in rats. *Lasers Surg. Med* 39:788–796
23. Tran-Hung L, Laurent P, Camps J, About I (2008) Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol* 53(1):9–13
24. Smith AJ (2003) Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ* 67(6):678–89
25. Denhardt DT, Lopez CA, Rollo EE, Hwang SM, An XR, Walther SE (1995) Osteopontin-induced modifications of cellular functions. *Ann N Y Acad Sci* 760:127–42
26. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J (2002) Osteopontin--a molecule for all seasons. *QJM* 95(1):3–13
27. Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM (1998) NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol* 141(4):1083–93
28. Pinheiro AL (2009) Advances and perspectives on tissue repair and healing. *Photomed Laser Surg* 27(6):833–6
29. Sommer AP, Pinheiro AL, Mester AR, Franke RP, Whelan HT (2001) Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg* 19(1):29–33
30. Pereira AN, Eduardo Cde P, Matson E, Marques MM (2002) Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med* 31(4):263–7
31. Harada H, Ohshima H (2004) New perspectives on tooth development and the dental stem cell niche. *Arch Histol Cytol* 67(1):1–11

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O presente estudo mostrou que o laser GaAlAs 780 nm, nos parâmetros utilizados, influenciou alguns aspectos do reparo do complexo dentina-polpa após injúria induzida por um movimento extrusivo dos incisivos superiores de ratos;
- A análise morfológica descritiva por microscopia de luz não revelou diferença entre os grupos controles e experimentais para a vascularização em incisivos superiores de ratos submetidos ao trauma extrusivo. Entretanto, foi observada inflamação em alguns espécimes do grupo não irradiado por laser;
- A avaliação histomorfométrica não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos irradiados e não irradiados para a densidade da camada de odontoblastos primários e para a espessura da matriz de dentina terciária. Contudo, a análise morfológica descritiva mostrou uma maior frequência de uma dentina reparativa bastante irregular nos espécimes injuriados e não irradiados com laser.

ANEXO



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa de protocolo número **054/2014**, intitulado “**Estudo morfológico da dentina reacional e dentina reparativa formadas após extrusão dos incisivos superiores de ratos irradiados com laser GaAlAs**”, sob a responsabilidade do Professor Doutor Márcio Cajazeira Aguiar, lotado no Departamento de Biomorfologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), está de acordo com as exigências legais atuais para experimentação animal e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **09 de maio de 2014**.

Salvador, 09 de maio de 2014.

Profª Dra. Tania Tavares Rodriguez
Coordenadora da CEUA-ICS