MARCO AURÉLIO VERLANGIERI ALVES

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DE CHOQUE
TÉRMICO NO TECIDO PERIODONTAL DE RATOS IRRADIADOS
COM LASER DE DIODO**

São Paulo

2009

Marco Aurélio Verlangieri Alves

**Expressão imunoistoquímica de proteínas de choque térmico no
tecido periodontal de ratos irradiados com Laser de Diodo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Profa. Dra. Luciana Corrêa

São Paulo

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alves MAV. Expressão imunoistoquímica de proteínas de choque térmico no tecido periodontal de ratos irradiados com Laser de Diodo [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, __/__/2009

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Nilton e Maria Eliza que dedicaram suas vidas aos filhos com todo amor, carinho e devoção. É com imensa admiração à eles que dedico esse trabalho.

Aos Professores da Disciplina de Patologia Geral e Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela amizade e convivência científica compartilhada.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Patologia Bucal, pela amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me dado a chance de ser filho do meu querido Nilton e amada mãe Maria Eliza, que dedicaram suas vidas com todo amor e companheirismo, me ensinando a importância dos valores e princípios éticos que guiam minha vida.

Ao meu irmão, companheiro insuperável a quem devo muito do que sou a sua esposa Rosane Diggelmann pela dedicação e também aos meus sobrinhos Enzo e Arthur por estarem sempre dispostos a sorrir e trazerem tantas alegrias para todos.

Aos meus avós, Amaral e Geny (*in memoriam*), Armando (*in memoriam*) e Maria pelo amor que só os avós são capazes de demonstrar.

À minha tia avó Flávia Verlangieri, Diolanda (*in memoriam*) e Nina (*in memoriam*) por tamanha dedicação e amor.

Aos meus tios Geonário, Maria Helena e Nilce pelos ensinamentos fundamentais para minha formação educacional.

Aos meus primos Carlos César e Lilian pelo companheirismo e vida compartilhada cheia de momentos sempre agradáveis.

Aos meus padrinhos Zé e Sônia pelo carinho eterno.

À minha namorada Melissa Egito pelo amor, dedicação e compreensão.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Luciana Correa por transmitir de modo extremamente coerente e coeso o que é ser professor; com sua compreensão e carinho pelos alunos ensina com amor e doação todo seu conhecimento.

Ao Prof, Dr. Moacyr Domingos Novelli pelo companheirismo, amizade, voz ativa e inventora, digna de um dos maiores cientistas da Universidade de São Paulo.

À minha amiga e companheira de mestrado Mayra Vasques Torres pela dedicação, compreensão e carinho transmitidos de maneira simples e fraternal.

À amiga Karen Renata pelos ensinamentos e companheirismo.

Aos amigos que sempre me incentivaram e acreditaram.

Aos professores Prof. Dr. Luiz Antonio Pugliesi A. de Lima do departamento de Semiologia, disciplina de Periodontia e à Profa. Dra. Patrícia Moreira de Freitas do departamento de Dentística da disciplina de Escultura Dental, pela ajuda de valiosa importância no exame de qualificação.

À CAPES pelo incentivo à pesquisa e oferecimento da bolsa de Mestrado no programa PROEX.

Ao IPEN – Instituto de Pesquisas Nucleares e ao CLA - Laboratório de Biofotônica e a equipe da Profa. Dra. Denise Maria Zezell e seus alunos Carol, Tiago e Moises pela parceria e empenho extremamente profissionais.

Ao Laboratório Especial de Laser em Odontologia – Lelo pela disponibilização do aparelho de Laser de Diodo.

Ao Laboratório de Experimental do departamento de Cirurgia pelo acesso e possibilidade de execução dos ensaios cirurgicos; em especial ao Prof. Dr. João Gualberto Cerqueira Luz.

Ao secretário da disciplina da Patologia Geral Sr. José Carlos e a todas as secretárias da disciplina de Patologia Bucal.

À Sra Elisa, técnica do Laboratório de Patologia Bucal, pelos ensinamentos e dedicação.

Ao Prof. Dr. Rubens Côrte Real de Carvalho pelo incentivo e amizade.

Ao Sr. Luiz Calos Pinto Costa pelo incentivo e por sempre acreditar nas possibilidades.

À Sra. Leila Crisitina Maria pelo carinho e atenção dispensadas.

À Secretária Srª Vânia e Glauci pela correção dos manuscritos.

Alves MAV. Expressão imunoistoquímica de proteínas de choque térmico no tecido periodontal de ratos irradiados com Laser de Diodo [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

As proteínas de choque térmico (HSP) são expressas em todas as células humanas, sendo superexpressas em condições de estresse celular, tais como hiper ou hipotermia, isquemia, inflamação e reparação. Dentre as várias famílias de HSP, encontram-se a Hsp27 e a Hsp47, cuja superexpressão relaciona-se à inibição da apoptose e à manutenção dos filamentos de actina do citoesqueleto (Hsp27) e à manutenção do sistema de produção de procolágeno e do colágeno (Hsp47). O laser de diodo (LD) tem atualmente amplas aplicações clínicas com vantagens terapêuticas comprovadas, porém os efeitos térmicos que pode acarretar aos tecidos ainda são controversos. Neste trabalho, avaliou-se a influência do LD sobre a expressão imunoistoquímica das Hsp27 e Hsp47 sobre o tecido dentário submetido a gengivoplastia com LD e com bisturi convencional, bem como relacionou-se essa influência com as variações de temperatura provocadas pela irradiação laser. Vinte e quatro ratos adultos foram divididos em dois grupos: grupo 1 – 12 animais submetidos a gengivoplastia no incisivo central inferior esquerdo utilizando laser de diodo (ZAP soft lase, 810 nm, 0,3 W, densidade de energia de 113,63 J/cm²); grupo 2 – 12 animais submetidos a gengivoplastia no mesmo local utilizando bisturi convencional. Os animais sofreram eutanásia nos períodos de 0h, 24h, 72h e 120h, sendo os incisivos centrais retirados e descalcificados. Posteriormente foram

submetidos a análise imunoistoquímica utilizando anticorpos monoclonais contra Hsp27 e Hsp47. Teste *in vitro* foi realizado utilizando-se incisivos centrais de ratos extirpados e mantidos resfriados até o momento do teste. Este foi realizado com a instalação de 4 termopares, os quais registraram a variação da temperatura durante gengivoplastia realizada com o LD calibrado com os mesmos parâmetros do teste *in vivo*. Observou-se haver variação máxima de temperatura entre 1°C e 6°C, dependendo da região analisada. A expressão da Hsp27 mostrou-se aumentada no grupo irradiado com laser em relação ao bisturi em praticamente todos os períodos experimentais. A Hsp47 também expressou-se mais intensivamente no grupo laser, porém mais tardiamente. A expressão de ambas as proteínas foi mais intensa na região irradiada, porém nas demais regiões medidas não foi possível relacionar as variações imunoistoquímicas com as de temperatura. Concluiu-se que o LD provoca modificações na expressão das Hsp27 e Hsp47, as quais podem estar relacionadas ao aumento da temperatura provocado pelo laser.

Palavras-Chave: proteínas de choque térmico, laser de diodo, variação de temperatura, gengivoplastia e imunoistoquímica

Alves MAV. Immunohistochemical expression of heat shock proteins in rat periodontal tissues irradiated with Diodo Laser [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

Heat shock proteins (HSP) are expressed in all human cells, and are overexpressed under conditions of cellular stress, such as hyper- or hypothermia, ischemia, inflammation and repair. Among the various families of HSP, there are Hsp27 and Hsp47, whose overexpression is related to the inhibition of apoptosis, maintenance of cytoskeletal actin filaments (Hsp27) and maintenance of the procollagen and collagen production system (Hsp47). At present, diode laser (DL) has broad clinical applications with proven therapeutic advantages; however, there is still controversy about the thermal effects it may have on tissues. In this study, the influence of DL on the immunohistochemical expression of Hsp27 and Hsp47 on dental tissue submitted to gingivoplasty with DL and a conventional scalpel was evaluated, as well as how this influence was related to the variations in temperature caused by laser irradiation. Twenty-four adult rats were divided into two groups: Group 1 – 12 animals submitted to gingivoplasty in the mandibular left central incisor using diode laser (ZAP soft lase, 810 nm, 0.3 W, energy density 113.63 J/cm²); Group 2 – 12 animals submitted to gingivoplasty in the same site using a conventional scalpel. The animals were euthanized in the periods of 0h, 24h, 72h and 120h, and the central incisors were removed and decalcified. Afterwards they were submitted to immunohistochemical analysis using monoclonal antibodies against Hsp27 and

Hsp47. The *in vitro* test was performed, using the extirpated central incisors of rats, which were kept chilled until the time of the test. This was done by installing 4 thermocouples that recorded the variation in temperature during the gingivoplasty performed with DL calibrated with the same parameters as those of the *in vivo* test. It was observed that there was a maximum variation in temperature of between 1°C and 6°C, depending on the region analyzed. Hsp27 expression was shown to be increased in the laser-irradiated group when compared with the group treated by scalpel in practically all the experimental periods. Hsp47 was also more intensely expressed in the laser group, however, much later. The expression of both proteins was more intense in the irradiated region, but in the other regions measured, it was not possible to relate the immunohistochemical variations with those of temperature. It was concluded that DL causes changes in the expression of Hsp27 and Hsp47, which may be related to the temperature increase caused by laser.

Keywords: heat shock proteins, diode laser, temperature variation, gingivoplasty and immunohistochemical

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
5 RESULTADOS	42
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	75

1 INTRODUÇÃO

Desde o primeiro relato, em 1964, do uso do laser de rubi em tecidos dentais por Goldman et al., muito tem-se investigado sobre os efeitos de outros tipos de laser nesses tecidos. O Laser de Diodo (LD) tem sido amplamente considerado para uso na cavidade oral, proporcionando uma nova possibilidade terapêutica dentro da Odontologia. O LD emite um comprimento de onda entre 810 e 960nm, com energia suficiente para incisar, vaporizar e coagular tecidos moles, bem como para gerar um efeito térmico que pode ser danoso às células, causando denaturação de proteínas e microexplosões dos líquidos intracelulares (HORCH; DEPPE 2005). Desse modo o uso do LD em situações cirúrgicas é possível, mas os efeitos causados pela energia térmica dissipada devem ser melhor investigados.

Apesar de vários trabalhos analisarem as características inflamatórias e reparativas dos tecidos submetidos à ação do laser (CONLAN; RAPLEY; COBB 1996; DAMANTE et al., 2004; D'ARCÂNGELO et al., 2007; LOWE et al., 1998; TAYLOR et al., 1997), a amplitude e as repercussões do dano térmico geradas por ele ainda precisam ser esclarecidas (JANDA et al., 2003). A ação do LD sobre as estruturas dentárias ainda é controversa, principalmente considerando-se as particularidades do tecido periodontal, dos tecidos mineralizados e do tecido pulpar.

A energia térmica dissipada em tecidos induz a liberação das proteínas de choque térmico (HSP). Há uma vasta produção científica que associa a presença de HSP diante de situações de estresse, tais como isquemia, hiper ou hipotermia e

reações auto-imunes (KUME et al., 1996; SALMINEN; VOELLMY; ROBERTS, 1997; SUMIOKA et al., 2004; TOLSON; ROBERTS, 2005). Contudo, a expressão das HSP durante estresse sobre o órgão dentário ainda precisa ser investigada. Diariamente nas situações operatórias da clínica odontológica (a utilização de instrumentos rotatórios e do laser) há geração de estresse térmico, aumento de temperatura, sobre os tecidos dentários, fato que constitui um modelo bastante interessante para o estudo das HSP nos tecidos orais. Algumas dessas proteínas geram um efeito protetor celular, anti-apoptose, bem como sua expressão está relacionada à produção de matriz extracelular (KOVALCHIN et al., 2006; TSAN; GAO, 2004).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Proteínas de choque térmico (“heat shock proteins” – HSP)

As proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* – HSP) são proteínas extremamente conservadas presentes em organismos tanto eucariotos quanto procariotos (GARRIDO et al., 2006) e constituem parte do grupo das chaperonas que são expressas intracelularmente em condições normais e, em situações de choque térmico, apresentam aumento de sua expressão (KOVALCHIN et al., 2006; TSAN; GAO, 2004). Atribui-se a essa família função citoprotetora por intermédio da mudança conformacional de outras proteínas, reunião de multicomplexos protéicos, termotolerância e anulação de mutações, prevenindo a agregação protéica, bem como contribuindo para nova síntese de proteínas. Elas atuam no processo de transformação tridimensional da proteína (denominado enrolamento ou enovelamento) por duas vias distintas: por intermédio do “abraçamento” da proteína nascente imediatamente ou não após a sua síntese ribossômica (por exemplo Hsp70), ou pela criação de microcompartimentos nos quais as proteínas recém-formadas e disponíveis no citossol são capturadas e enroladas (estão são as chamadas chaperoninas, por exemplo, a Hsp60, que possuem conformação cilíndrica composta por anéis duplos ocos) (HARTL; HAYER-HARTL, 2002).

A classificação das HSP depende do tamanho (massa molecular em kDa) e da função da proteína analisada. As grandes famílias são HSP40, 60, 70, 90, sendo a HSP70 e 90, e seus membros Hsp70 e Hsp90, as mais estudadas nos processos reparativos. As pequenas HSP são o grupo de proteínas com peso molecular entre 10 e 30 Kda e compartilham seqüências homólogas e propriedades bioquímicas, como a fosforilação e a oligomerização. O quadro abaixo demonstra as funções específicas e as proteínas de cada família nas células eucarióticas.

Peso molecular aproximado (kDa)	Proteína na célula eucariótica	Função
10	Hsp10	Co-fator da Hsp60
20-30	Grupo HspB. São dez membros nos mamíferos, incluindo Hsp27 e HspB1	Modulação da dinâmica da actina do citoesqueleto
40	Hsp40	Atuação em conjunto com Hsp70, prevenindo a agregação de proteínas nativas e apresentando-as a Hsp70 para enrolamento
60	Hsp60 (chaperonina)	ATPase; promoção de dobramentos eficientes; formação de tetradecâmeros quando na presença de ATP e Hsp10; encontrada nas mitocôndrias ou no citosol; dobramento de actina e tubulina (chaperonina)
70	Grupo HspA, incluindo Hsp71, Hsc70 (ou Hsp73), Hsp70 citosólico (ou Hsp72), Hsp70 mitocondrial, GRP78 (BiP – do retículo endoplasmático) e Hsx70 (encontrada somente em primatas)	ATPase; estabilização de proteínas previamente ao dobramento; transporte através de membranas; proteólise; associação ao p53 no citosol e a cadeias pesadas de imunoglobulinas; no citosol; termotolerância
90	Grupo HspC, incluindo Hsp90 (mitocondrial, citosólica ou do retículo endoplasmático) e grp94 (proteína reguladora de glicose)	Estabilização de proteínas previamente ao completo dobramento ou ativação; formação de complexos estáveis com receptores glicorticóides inativos e com outros fatores de transcrição
100	Hsp104, Hsp110	ATPase, facilitação da proteólise; tolerância a temperaturas extremas

Adaptado de Landry (1998). Informações complementares obtidas de Tsan e Gao (2004) e de Fan, Lee e Cyr (2003).

Quadro 2.1 - funções específicas das Hsps de cada família nas células eucarióticas

Muitas situações de estresse celular podem provocar aumento da expressão das HSP, tais como privação de glicose, contato com toxinas bacterianas e com metais pesados, estresse oxidativo e situações de reparação tecidual, na qual há grande atividade de proliferação e diferenciação celular (KOVALCHIN et al., 2006; TSAN; GAO, 2004). Há meios de se manipular a expressão de Hsps em animais de laboratório quando se expõem os mesmos a condicionamentos físicos e químicos. Estes podem ser listados como imersão em água, aumento da temperatura do solo, aplicação de calor local, irradiação com laser, ultrassom, microondas, uso de fármacos, alterações genéticas nos animais (transgênicos), dentre outros métodos (exercícios, tratamento frio e estresse psicológico) (TOLSON; ROBERTS, 2005).

A Hsp47 é uma proteína que está presente no retículo endoplasmático, sendo a primeira a ser identificada como a maior construtora de colágeno (ANFINSEN, 1973; NAGATA; YAMADA, 1986). É responsável pela produção de vários tipos específicos de colágeno e procolágeno. Em condições de estresse é uma das proteínas que fazem parte do sistema de controle de qualidade do procolágeno, prevenindo a secreção do mesmo com conformações anormais. A presença dessa proteína está associada também a situações de fibrose (NAGATA, 1996, 1998).

A Hsp27 é uma chaperonina com propriedades nos eventos anti-apoptose e participa em múltiplos passos na sinalização da cascata da apoptose (GARRIDO, 2006). Sua ação se dá independentemente de ATP (diferentemente das HSPs de maior peso molecular, tais como HSP90, 70 e 60) (PARCELLIER et al., 2003).

Além de controlar a apoptose, a Hsp27 regula a aderência de fibroblastos, bem como o alongamento, a migração e a contração da matriz flutuante (matriz

extracelular) de uma forma dependente da intensidade de sua expressão após condição de estresse tecidual (HIRANO; SHELDEN; GILMONT, 2004). No estudo de destes autores, foi utilizado um modelo visando a cicatrização; assim populações de fibroblastos (FPCL) foram observadas quanto a expressão exacerbada ou baixa da Hsp27 (Hsp27(SS12) ou Hsp27(AS10), respectivamente) em meios de cultura de células embrionárias de camundongos, as quais eram estabelecidas dessa maneira para o estudo da contração da “ferida” dependentes da Hsp27. Em ensaios de contração em FPCL, quando se observava SS12 havia aumento da contração da matriz flutuante, ao contrário da AS10, onde notava-se redução da contração.

2.1.1 Hsp25/27 e Hsp47 em estruturas da cavidade bucal

Os trabalhos a seguir envolvem, em sua maioria, a expressão imunoistoquímica da Hsp25 nos tecidos dentários. A Hsp25 em ratos é considerada homóloga à Hsp27 em ratos e humanos (OTSUKA et al., 2001), sendo portanto possível extrapolar as informações da literatura para ambas as proteínas, considerando-se os modelos descritos em animais e humanos.

Sens et al. (1996), em estudo em 16 terceiros molares removidos por motivos ortodônticos, observaram a existência de Hsp25 em odontoblastos e fibroblastos na

polpa; na parede vascular, detectaram essa proteína expressa em músculo liso e células endoteliais.

Ohshima et al. (2000) observaram o papel da Hsp25 na odontogênese a partir da sua expressão em células mesenquimais da polpa, odontoblastos e ameloblastos no incisivo central de rato, por meio de testes imunoistoquímicos. A expressão da Hsp25 nos odontoblastos foi intensa, principalmente os bem diferenciados, destacando-se nessa expressão a porção secretora na zona da pré-dentina. Na polpa dental as células mesenquimais indiferenciadas e os fibroblastos apresentaram forte marcação no terço apical. Essa positividade decresceu ao avançar até a porção média do dente, onde a mesma desapareceu. As células endoteliais e o músculo liso do componente vascular presente na polpa apresentaram-se negativos. Os ameloblastos mais bem diferenciados e com atividade secretora apresentaram positividade em todo seu citoplasma, ao contrário dos menos diferenciados e das células do estrato intermediário, que foram negativos ou fracamente positivos. A partir da intensa expressão dos odontoblastos e dos ameloblastos bem diferenciados, os autores discutem o envolvimento da Hsp25 no processo de adaptação do citoesqueleto dessas células à nova conformação anatômica que se estabelece a partir da deposição do esmalte e da dentina, uma vez que a Hsp25 está relacionada com a manutenção dos filamentos de actina do citoesqueleto.

Otsuka et al. (2001) desenvolveram estudo sobre o possível papel da Hsp25 no órgão do esmalte durante a amelogênese no molar de ratos. Foram utilizados 20 ratos com idade entre 1, 4-7, 9-11, 15 e 17 dias de vida (n=4). A maxila foi removida para o desenvolvimento do trabalho. Os resultados encontrados foram

semelhantes aos sugeridos por Ohshima et al. (2000). Contudo, no que diz respeito à área livre de esmalte, os autores detectaram forte expressão nas células que supostamente sofrerão apoptose. Outra observação foi a marcação de pré-ameloblastos e a ausência desta no interior das células epiteliais do órgão do esmalte.

Ohshima, Nakamura-Ohshima e Maeda (2002) observaram o papel da Hsp25 durante a odontogênese em dentes com crescimento limitado, a partir de análise imunoistoquímica da polpa dental e do órgão do esmalte. Foram utilizados 20 ratos com idade entre 1, 4-11, 15-17, 30 e 100 dias de vida (n=4). A expressão da Hsp25 variou de acordo com o estágio de desenvolvimento da odontogênese, sendo bastante semelhante ao trabalho de Ohshima et al. (2000), exceto na variação observada entre a localização dos odontoblastos (raiz, porção coronal ou teto da câmara pulpar). Esses dados podem indicar a possibilidade de a Hsp25 ser um marcador para distinguir odontoblastos diferenciados e indirenciados. Isso porque a Hsp25 tem sido observada fortemente nas fases iniciais de diferenciação concomitantemente com decréscimo da taxa de proliferação celular.

Leonardi et al. (2004), em estudo de imunolocalização da Hsp27 em ossos gnáticos e germes dentários em fetos humanos, observaram forte presença dessa chaperonina em células responsáveis pelo desenvolvimento das estruturas dentárias. Os autores detectaram durante as fases iniciais da odontogênese que a Hsp27 tem especificidades regionais e temporais no que diz respeito ao padrão de expressão durante o desenvolvimento dentário. Na fase de botão, a Hsp27 foi detectada praticamente em toda sua extensão, exceto nas células do epitélio dental voltadas

para o mesênquima condensado. Na fase precoce de capuz, uma forte imunomarcagem para Hsp27 foi vista na lâmina dentária e uma moderada marcação no epitélio externo. Já na fase tardia a expressão da Hsp27 foi observada na lâmina dental, no epitélio externo e nas células do futuro retículo estrelado. Durante o início da campânula, não houve imunorreação no germe dental, aparecendo apenas na lâmina dental.

Harada et al. (2008) demonstraram, em estudo com 44 ratos Wistar (100 dias de vida) submetidos a preparo cavitário com caneta de alta-rotação e com irrigação, a dinâmica das células no processo de cura dentro da polpa e expressão imunohistoquímica da Hsp25. Notaram que praticamente todos os odontoblastos da área submetida à ação de ponta de tungstênio durante o preparo cavitário foram degenerados e, na sequência, células recentemente diferenciadas como odontoblastos rearranjaram-se na borda do complexo dentina-polpa e expressaram a Hsp25. Algumas células mesenquimais associadas aos capilares subodontoblásticos também apresentaram imunoreação. Os autores concluíram que a Hsp25 está envolvida no processo de migração de células mesenquimais indiferenciadas pulpares para o local de agressão, bem como na diferenciação destas em odontoblastos.

Comparando a expressão da Hsp47 e de colágeno (tipos I, III e IV) em fêmures e molares de ratos em desenvolvimento, Shroff et al. (1993) verificaram que a expressão da Hsp47 está atrelada somente a células produtoras de $\alpha 1$ -procolágeno, não sendo expressa em outras moléculas de procolágeno homotriméricas.

Coletta et al. (1999) demonstraram a relação entre o aumento da expressão da Hsp47 e a secreção de colágeno observados a partir de cultura de fibroblastos humanos, os quais foram colhidos de pacientes com gengiva normal (NG). Observaram também células colhidas de pacientes com hiperplasia gengival hereditárias (HGF - autossômica dominante). Os autores detectaram produção elevada de colágeno tipo I pelos fibroblastos da HGF comparados ao NG. A expressão e a produção de Hsp47 também foi maior na HGF. Os autores concluíram que a Hsp47 está fortemente relacionada a biossíntese e secreção de procolágeno, tanto em condições fisiológicas quanto patofisiológicas.

Yoshimatsu, Uehara e Yoshida, em 2008, verificaram, a partir do movimento ortodôntico em dentes de ratos, a expressão da Hsp47 no ligamento periodontal. Para isso, foi desenvolvido um modelo experimental de modo a possibilitar a movimentação dentária para o lado mesial do molar superior com uma força de aproximadamente 10g. Estudos imunoistoquímicos para Hsp47 e PCNA foram realizados. Notou-se aumento da expressão da Hsp47 no lado distal do ligamento periodontal nos animais com 2 dias de ativação ortodôntica, indicando que a remodelação do colágeno ocorre principalmente no lado de tensão. No lado mesial (lado da pressão) não se notou aumento importante na expressão da Hsp47. Esses achados indicam que a pressão sobre células do ligamento periodontal tem pouca influência sobre a síntese de colágeno. No presente estudo, a expressão de Hsp47 foi também detectada na polpa dentária. Os autores especularam que mudanças no fluxo sanguíneo na polpa dentária durante o processo ortodôntico pode ter acarretado estados de hipóxia que levaram à expressão da Hsp47. Quanto ao PCNA,

os autores verificaram expressão igual tanto no lado mesial quanto no distal, sugerindo haver estímulo igual à proliferação celular em ambas as faces.

2.2 Laser de Diodo: características e aplicações clínicas

O LD surgiu na década de 90 e tem demonstrado diversas aplicações na área da odontologia. Seu comprimento de onda varia dos 400nm aos 980nm abrangendo o espectro vermelho e infravermelho. Em alta potência, os principais equipamentos à disposição no mercado utilizam a faixa do infra-vermelho entre 810nm e 980 nm (GUTNECK; FRANZEN, 2004).

Estudos recentes com os LD vêm demonstrando alta eficiência em cirurgias de tecido mole, como remoção de tumores, frenectomias, gengivectomias e vestibuloplastias, promovendo incisões precisas, hemostasia e um bom pós-operatório quando utilizados com parâmetros adequados, devido à afinidade desses comprimentos de onda com os pigmentos dos tecidos moles (ROMANOS et al., 2004).

Sobre tecidos duros, em condições específicas e diferenciadas dos tecidos moles, os LD de alta potência podem ablacionar esmalte e dentina (esse procedimento pode ser mais eficiente se associado com um cromóforo absorvedor do

feixe laser) e fusão do esmalte dental (AOKI et al., 2006; MCNALLY; GILLINGS; DAWES, 1997).

Coleton (2004) indica o LD para aplicações clínicas em cirurgias em tecido mole oral e para redução bacteriana local em bolsa periodontal. Moritz et al. (1998) propuseram o uso de LD para tratamento de indivíduos com bolsas periodontais, já que os estudos *in vitro*, do mesmo autor, haviam sugerido resultados muito favoráveis no que diz respeito à redução bacteriana. Desse modo os pacientes foram divididos em dois grupos, os quais deveriam ter ao menos 1 bolsa periodontal de 4mm de profundidade: 37 submetidos ao tratamento com LD (Dentek Laser System, 805nm, 2,5W, com duração de pulso em 10ms, 50Hz, sendo utilizado 3s para bolsas de 3mm, 4s para de 4mm e 5s para de 5mm) e 13 submetidos apenas a tratamento convencional (irrigação com peróxido de hidrogênio). Durante as consultas, foram removidas amostras, com cones de papel estéril, das bolsas periodontais para verificação microbiológica. Observaram maior redução bacteriana em bolsas periodontais com aplicação do LD, concluindo que a aplicação deste em bolsas periodontais pode ser utilizado como tratamento suplementar à redução microbiológica das bactérias causadoras da doença periodontal.

Adams e Pang (2004) demonstraram o uso clínico do LD em paciente com necessidade estética de gengivoplastia. Respeitando os limites do espaço juncional, os mesmos relatam sucesso no procedimento. Utilizaram LD com fibra de 0,4mm e potência de 0,8W em modo contínuo para realização de gengivoplastia em maxila (elementos dentários 13, 12, 11, 21, 22 e 23).

2.2.1 Laser de diodo e reparação tecidual

Alta produção de colágeno e maior proliferação fibroblástica foram observados por Taylor et al. (1997) em incisões lineares feitas em pele de ratos utilizando LD (805nm, 10W contínuo, $1,4 \times 10^4$ W/cm² de densidade de energia estimada) e laser de Nd:YAG (1064nm, 10W, contínuo, $1,4 \times 10^4$ W/cm² de densidade de energia estimada). No tempo de sete dias observou-se que os animais operados com LD apresentaram menores sinais inflamatórios e maiores áreas de dano térmico comparativamente ao laser de Nd:YAG; ambos os lasers exibiram infiltrado inflamatório mais intenso comparativamente ao bisturi convencional. Ao final de 21 dias, remodelação colagênica e ausência de inflamação foram observados na mesma intensidade nos grupos tratados com laser e com bisturi convencional.

Janda et al. (2003) compararam o efeito térmico gerado por LD (modo contínuo, com 830 e 940 nm), Nd:YAG (1064nm) e Ho:YAG (3-20Hz, duração do pulso de 250ms, 2080nm), todos com contato sobre a superfície tecidual (tecido muscular de peru), gerando energia próxima de 800J/cm². Os autores verificaram carbonização severa na superfície tecidual com LD e Nd:YAG, e pouca denaturação/coagulação protéica na profundidade dos tecidos, contrariamente ao laser de Ho:YAG, o qual provocou ablação e grandes áreas de coagulação tecidual.

Damante et al. (2004) analisaram histometricamente a mucosa gengival de pacientes submetidos a gengivoplastia realizada à maneira convencional com bisturi

e, em seguida, submetida à irradiação de LD em baixa intensidade (670 nm, 4J/cm²) em três pontos em contato leve com a região de mucosa queratinizada no lado direito de maxila e mandíbula. Compararam esse lado com a mucosa gengival sem irradiação no lado esquerdo de maxila e mandíbula. Biópsias foram obtidas de cada região em um dos períodos pós-cirúrgicos que foram 7, 14, 21 e 60 dias, realizadas na área da papila gengival entre o incisivo lateral e o canino. Os autores não verificaram diferenças no processo de regeneração epitelial e da lâmina própria da mucosa gengival entre os espécimes estudados.

D'Arcangelo et al. (2007) analisaram a síntese de óxido nítrico em incisões realizadas com bisturi convencional e com LD (4W e 6W por aproximadamente 6s) no palato duro de ratos machos adultos. O óxido nítrico (NO) é considerado um dos principais sinais biológicos de importante função imunológica, podendo ser observado em três isoformas sintetizadoras: eNOS – endotelial, iNOS – induzida, e nNOS – neuronal, sendo essa última não analisada. Verificaram nos tecidos reparativos dos animais irradiados com LD maior reação inflamatória em relação ao bisturi, observada pelos altos níveis de iNOS e eNOS, principalmente nos espécimes irradiados com 6W, em que a organização tecidual para reparação deu-se apenas a partir do sétimo dia.

2.2.2 Laser de diodo e a variação de temperatura em tecidos bucais

Fontana et al. (2004) observaram, em experimentos *in vitro* e *in vivo*, a variação de temperatura em tecido gengival de ratos *Wistar*. A partir do uso de transmissor térmico acoplado a um computador, demonstraram que, em aplicações com duração de 3 segundos e 600mW, a variação de temperatura é segura, 3° C, sem causar dano térmico irreversível às células.

Kreisler, Al-Haj e D'Hoedt (2002) observaram segurança no que diz respeito ao possível dano térmico em irradiações em dentes humanos *in vitro*. Cinco incisivos superiores e 5 inferiores, extraídos devido a problemas peridontais, tiveram suas polpas removidas e o canal acessado e preparado com limas endodônticas K-file até a lima 60. O acesso ao canal foi fechado com resina fotopolimerizável e os dentes foram fixados em lâmina de microscopia. Foram irradiados com Laser 809-nm GaAlAs (ORALASER Voxx; Oralie GmbH, Konstanz, German), utilizando-se potências de 0,5W até 2,5W em modo contínuo (0Hz), com densidade de energia variando de 235,6 e 1326,9 Wcm⁻². Os espécimes foram colocados em banho-maria a 37°C, mantendo-se fora do banho apenas a área que seria irradiada. Para verificação da temperatura intrapulpar foi colocado um *thermocouple* de 0,5mm K-type (Omega Engineering, Stamford, Conn) inserido pelo forame apical do dente em questão. As variações de temperatura durante a irradiação foram gravadas por esse medidor multicanal digital e, após a irradiação, aguardou-se a temperatura voltar aos 37°C, simulando condições como *in vivo*. Foram observadas variações de temperatura de 0,5 a 32°C.

Os autores concluíram que, para se obterem temperaturas seguras (variação máxima de 5°C), a potência a ser utilizada deve ser de 0,5W por 10 segundos em elementos anteriores até pré-molares. Os que possuem parede dentinária maior que 2mm na porção média do canal podem ser irradiados com 1,0W pelo mesmo tempo.

Sulieman, Rees e Addy (2006), em estudo de variação de temperatura em condições de clareamento dental, observaram que, com irradiação do LD, a leitura do aumento de temperatura sofreu grandes variações, dependendo da potência utilizada. Foram feitas 144 aplicações de gel clareador em elementos dentários (incisivos centrais, laterais e caninos dos arcos superior e inferior), para estudar as variações de temperatura intrapulpar e 24, para o estudo da superfície dentária. Partindo-se da temperatura basal de 37°C com variações de potência de 1W, 2W e 3W por 30 segundos em todos os casos, observaram variação de temperatura de 37°C (1W) até 86,3°C(3W) sem a colocação do gel clareador no elemento dentário. Com a colocação do gel clareador, notou-se redução na variação de temperatura, sugerindo que o mesmo fornece um tipo de película isolante contra o calor: 4,3°C (1W) até 16°C (3W). Assim, tendo como base 5,5°C de variação máxima segura sem lesão irreversível à polpa, o uso do LD para clareamento dentário é seguro quando usado com potência de 1 ou 2W.

2.3 HSP e laser em estruturas da cavidade bucal

Suzuki et al. (2004) verificaram a expressão da proteína Hsp25 e de antígenos de histocompatibilidade classe II (MHC-II) (OX6) em polpa de dentes de ratos submetidos a preparo cavitário com laser de CrTmEr:YAG laser (2,69 mm, 200–250 mJ/pulso, 5 pulsos/s). Os animais foram sacrificados nos períodos de 0h, 6h, 12h, 24h, 3 e 5 dias pós-preparo (6 animais por grupo). Nos períodos iniciais do experimento, não foi detectada expressão da Hsp25 nos locais onde houve exposição ao laser e células dendríticas exibiram marcação positiva para OX6. As células positivas para OX6 no período de 24h permeavam o infiltrado inflamatório adjacente ao local do preparo, e positividade para Hsp25 foi observada em células que exibiam prolongamentos e que estavam adjacentes a odontoblastos inviáveis. No 3º dia, foi observada formação de abscesso e positividade para Hsp25 e OX6 em células adjacentes a essa reação tecidual. Os autores concluíram que o abscesso foi decorrente de invasão bacteriana e que a variação da expressão das proteínas indicadas é resultado dessa contaminação secundária, a qual pode não ser de fácil controle quando se utiliza o laser em preparos cavitários dentários.

Tate et al. (2006) verificaram o efeito do laser de GaAlAs (810nm, 180s, 0,5 a 1,5W) sobre a polpa dental de ratos, aplicando o laser sobre a face dentária distal e posterior eutanásia nos períodos de 6-24h, 3-5 dias, 7 dias e 30 dias pós-aplicação. Os autores estudaram a expressão imunoistoquímica da Hsp25 em relação a diferentes parâmetros do laser. Em 8 horas, houve intensa expressão da Hsp25 nos

odontoblastos da coroa e uma fraca marcação nos demais componentes pulpaes, principalmente vasos sanguíneos e fibras nervosas. Em 7 dias, essa marcação oscilou dependendo dos parâmetros do laser: com 0,5W houve intensa marcação na porção coronária e com 1,5W, essa intensidade só foi observada na porção distal, ou seja, oposta a da aplicação do laser. Em 30 dias, os autores observaram maior intensidade de marcação na região de dentina terciária formada, bem como em tecidos osteóides. Concluíram que, pela permanência da expressão da Hsp25, a qual é um potente marcador para a diferenciação osteoblástica, é possível depreender que os odontoblastos continuaram viáveis após a aplicação do laser, sendo este indicado para obturar o canal pulpar por intermédio da deposição de dentina reparativa.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Verificar a ação da irradiação do laser de diodo sobre a variação de temperatura e a expressão imunoistoquímica das proteínas Hsp27 e Hsp47 no incisivo central de ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar anatomo-cronologicamente a expressão das proteínas supracitadas em incisivos centrais de ratos submetidos a gengivectomia com laser de diodo e com bisturi convencional em 4 tempos experimentais (0h, 24h, 72h e 120h);
- Verificar as variações de temperatura durante a irradiação laser em quatro locais do dente próximos ao ponto de irradiação;
- Relacionar a expressão das proteínas Hsp27 e Hsp47 com essas variações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia a seguir foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, Subcomissão de Bioética de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo A).

4.1 Grupos experimentais

Vinte e quatro animais (*Rattus norvegicus*), adultos, fêmeas, com cerca de 200g, foram divididos aleatoriamente em dois grupos:

- a) Grupo 1 (12 animais) - remoção de tecido mucogengival próximo à coroa clínica do incisivo central esquerdo inferior com o uso de bisturi convencional e lâmina 15c.
- b) Grupo 2 (12 animais) - remoção de tecido mucogengival próximo à coroa clínica do incisivo central esquerdo inferior do animal, utilizando laser de diodo.

Todos os animais foram submetidos à anestesia com injeção intraperitoneal de quetamina (Dopalen®, Vetbrands) associada a xilazina (Anasedan®, Vetbrands), na proporção 0,1 ml/kg de quetamina e 0,01ml/kg de xilazina.

Os animais sofreram eutanásia com overdose de anestésico nos tempos experimentais de 0h, 24h, 72h e 120h pós-cirúrgico (3 animais para cada período). Foram mantidos durante o experimento no Laboratório Experimental da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da USP, com ciclo claro-escuro e sob exaustão de ar e temperatura controlada (21°C).

4.2 Remoção de tecido por bisturi

Os animais do grupo 1 foram submetidos à cirurgia de aumento de coroa clínica a partir do uso de lâmina de bisturi 15c. Portando equipamentos de proteção individuais (EPIs), os procedimentos foram executados por um único operador, juntamente com auxiliar, para manutenção da abertura da boca do animal e afastamento da mucosa labial, respeitando todos os pré-requisitos de anti-sepsia utilizados em ambientes ambulatoriais.

O ato cirúrgico foi desenvolvido com o intuito de se remover parte da gengiva inserida do incisivo central inferior esquerdo do animal, focando-se nos limites da

região vestibular e distal em sua totalidade. Desse modo, após o processo de anestesia, o mesmo era submetido à cirurgia em posição de decúbito dorsal; o acesso à área a ser operada era intra-oral e para manutenção do mesmo eram utilizados afastadores de Wolkman manuseados pelo auxiliar. A incisão era feita em toda a extensão da gengiva inserida de vestibular para distal; a mesma era removida com cureta de Lucas e a hemostasia era feita com gaze estéril.

Figura 4.1-Desenvolvimento do aumento de coroa clínica a partir de bisturi convencional – lâmina 15c. Aspecto clínico imediatamente após a remoção do tecido gengival. Observar que a remoção contempla toda a região vestibular e distal

4.3 Aplicação do laser de diodo

Os animais do grupo 2 receberam tratamento com laser de diodo de alta potência (ZAP soft lase, 810 nm), o qual foi aplicado em modo focado com os seguintes parâmetros:

Potência	0,3 W
Área	0,44cm ²
Irradiância	398,08 W/cm ²
Densidade ε	113,63 J/cm ²
Tempo	8s
Modo	Foco/contínuo/contato

A potência do Laser foi calibrada com medidor de potência do feixe laser para que não houvesse diferença da dosagem de irradiação aplicada em cada animal. O valor da área de irradiação foi obtido pelo software Imagelab2000® (ImageLab, São Paulo, Brasil) por intermédio da digitalização da imagem da região cervical do incisivo central inferior, com posterior delimitação da região irradiada.

Após a anestesia do animal, colocava-se o mesmo em decúbito dorsal para que a irradiação fosse executada. O acesso à área a ser operada era intra-oral e para manutenção do mesmo eram utilizados afastadores de Wolkman manuseados pelo auxiliar; todos os pré-requisitos, em termos de necessidade cirúrgica, citados no ato

com bisturi lâmina 15c foram obedecidos. Feita a irradiação, utilizava-se cureta de Lucas para remoção de eventuais restos teciduais e gaze estéril umidificada com soro fisiológico solução à 0,9% de NaCl. Foram respeitados também todos os pré-requisitos de anti-sepsia utilizados em ambientes ambulatoriais, com ambos os operadores portando óculos de proteção específicos para o comprimento de onda do laser de diodo e demais equipamentos de proteção individuais (EPIs). O equipamento de laser foi fornecido, sob empréstimo, pelo Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO) da Faculdade de Odontologia da USP. A cada utilização, o aparelho era calibrado com medidor de potência do feixe laser, desprezando-se o dado observado no display digital do aparelho.

Figura 4.2-Aspecto clínico imediatamente após a irradiação com Laser de Diodo. Observar que a remoção contempla toda a região vestibular e distal; nota-se ausência de sangramento local e sinal de dano térmico na região irradiada

4.4 Coleta e descalcificação do material

Para análise tecidual, a mandíbula foi removida, eliminando-se a região posterior, tendo em vista apenas a região anterior que contém os incisivos centrais, a qual foi fixada em formol 10% durante 24h, lavada durante 20 minutos em água corrente e posteriormente colocada em solução com EDTA 10%, pH 7,4 para descalcificação durante 3 semanas. Após esse processo a mesma foi dividida no sentido longitudinal do incisivo central. Em seguida, o espécime permaneceu mais uma semana na solução de EDTA, quando então a descalcificação foi confirmada pelo livre deslizamento da navalha sobre o tecido. Direcionou-se então o material para processamento histológico de rotina e emblocamento em parafina. Esse fragmento foi destinado à obtenção de cortes histológicos para técnica de imunoistoquímica e para técnica de coloração em hematoxilina e eosina (HE).

4.5 Técnica de imunoistoquímica

Para as reações imunoistoquímicas, foi utilizada a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase e foram usados anticorpos monoclonais contra Hsp27 (Abcan Inc.

Cambridge, Massachusetts) e Hsp47 (Abcan Inc. Cambridge, Massachusetts). Cortes de 4 µm de espessura foram obtidos dos fragmentos de mandíbula emblocados em parafina e estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropiltrietoxisilano. Esses cortes foram desparafinados e reidratados em série descendente de etanóis. Para a utilização dos anticorpos contra Hsp27, fez-se necessária a recuperação antigênica, a qual foi desenvolvida a partir de recuperação enzimática por pipetagem, seguindo o método proposto pelo fabricante do anticorpo. Após recuperação enzimática, todas as lâminas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena tecidual, inclusive as obtidas para evidencição da Hsp47. Realizou-se a incubação do anticorpo primário, seguida pela incubação do anticorpo secundário e do complexo terciário (estreptavidina, biotina e enzima peroxidase). Para a incubação do anticorpo secundário e do complexo terciário foi utilizado kit LSAB (Dako). A reação então foi revelada pela diaminobenzidina (Dako). Os cortes foram contra-corados pela hematoxilina de Mayer, desidratados em série crescente de etanóis, diafanizados em xilol e montados em resina para microscopia de luz convencional. Para o controle negativo das reações, os cortes foram incubados em tampão sem anticorpo primário. A fidelidade da marcação positiva foi confirmada pela semelhança da marcação com trabalhos publicados na literatura com a mesma proteína (D'ARCANGELO et al., 2007; SUZUKI et al., 2004; TATE et al., 2006). Os testes imunoistoquímicos foram realizados no Laboratório de Imunoistoquímica da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP e no Laboratório de Patologia Experimental da Disciplina de Patologia Geral da FOU SP.

4.6 Análise qualitativa e semiquantitativa da expressão imunoistoquímica

Foi feita análise qualitativa descritiva dos cortes histológicos corados em HE e destinados aos testes imunoistoquímicos. Os cortes em HE foram destinados à análise morfológica do processo reparativo tecidual; nos cortes dos testes imunoistoquímicos focalizou-se principalmente o padrão de marcação na gengiva marginal vestibular e lingual, nos ameloblastos e odontoblastos, no tecido conjuntivo pulpar e na dentina, no osso alveolar, nos fibroblastos e nas fibras do ligamento periodontal, e em células inflamatórias.

Para a análise semiquantitativa, todos os cortes submetidos à técnica imunoistoquímica foram analisados cegamente por dois examinadores previamente calibrados, os quais observaram a intensidade de marcação para Hsp27 e Hsp47 nas seguintes estruturas dentárias: gengiva marginal (vestibular e lingual), ligamento periodontal (vestibular e lingual) e ameloblastos. As estruturas do periodonto e os ameloblastos foram analisados nos terços cervical, médio e apical da raiz separadamente. Foram quantificadas somente essas estruturas por serem as presentes constantemente e integralmente em todos os cortes histológicos, sem artefatos. A gradação da intensidade foi de 0 = ausência de marcação; 1 = marcação discreta; 2 = marcação moderada; 3 = marcação intensa. Ao final da análise foi feita média aritmética simples dos valores encontrados nos 3 indivíduos para cada período experimental de cada grupo.

4.7 Análise da Variação de temperatura

Foi realizado no Laboratório de Biofotônica do Centro de Laser e Aplicações - CLA do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN - CNEN/SP), teste *in vitro* para observar a variação de temperatura na condição do uso do Laser de Diodo. Foram coletadas 8 cabeças de ratos submetidos a eutanásia por overdose de anestésico, as quais foram congeladas até o momento do experimento. Neste, foram descongeladas em banho-maria a 37°C, quando então sofreram gengivectomia nos incisivos centrais inferiores seguindo-se o mesmo procedimento dos testes *in vivo*. Durante o procedimento de irradiação foi medida a variação de temperatura com termopares. Os termopares calibrados utilizados eram do tipo K (cromel-alumel) (OMEGA Eng. Inc. – Stamford, CT, USA), cada um com uma espessura de 1,27mm.

Figura 4.3 - Termopar OMEGA Eng. Inc. – Stamford, CT, USA

Os termopares foram posicionados em quatro regiões: Canal 0 – Ápice; Canal 1 – Distal; Canal 2 – Mesial; e Canal 3 – Lingual. Para sua fixação, foi utilizado barreira gengival fotopolimerizável e, para favorecer o contato térmico adequado

entre a ponta do termopar e a amostra, foi colocada pasta térmica de condutividade térmica $1,67\text{W/mK}$. A pasta térmica utilizada tem maior condutividade que a água, para assegurar uma transmissão de calor eficiente.

Figura 4.4 - Posicionamento dos termopares em região próximas ao incisivo central esquerdo irradiado. (Canal 0 – Ápice - A; Canal 1 – Distal - D; Canal 2 – Mesial - M; e Canal 3 – Lingual - L)

Com o aquecimento da junção do termopar ocorre uma indução de corrente elétrica. Essa corrente induzida é coletada e enviada pelos dois fios do termopar até uma placa de aquisição NI USB 9219 (*National Instruments*). A placa de aquisição recebe os sinais gerados pelos termopares, que são registrados utilizando-se um computador, por meio do software NI LabVIEW SignalExpress. Nesse software é possível acompanhar em tempo real as variações de temperatura e transportar os dados resultantes do experimento para outras extensões, como Microsoft Excel®, Openoffice (Sun Microsystems), entre outros da mesma linha.

O

registro da temperatura iniciava-se 10 segundos antes da irradiação e encerrava-se 20 segundos após seu término. Foi possível verificar as variações de temperatura em cada região durante toda a irradiação. Como estas foram grandes e bastante

dispersivas, optou-se em verificar se o operador estava interferindo na análise, ou seja, se variações de irradiação provocadas pelo operador estavam interferindo na medição. Para tal, selecionou-se a amostra de número 8. Os termopares foram fixados nas respectivas regiões de análise, sendo o procedimento de irradiação realizado cinco vezes. Antes de se iniciar cada procedimento, foi verificado se a temperatura da amostra já tinha estabilizado, ou seja, garantiu-se que as condições iniciais das medidas fossem as mesmas.

Os dados de variações de temperatura foram tabulados no Microsoft Excel® para análise estatística descritiva.

5 RESULTADOS

5.1 Variação da temperatura analisada *in vitro*

Mediu-se a variação de temperatura nas quatro regiões de interesse nas oito amostras. O Gráfico 5.1 ilustra a variação de temperatura na amostra 1, a título de exemplo, a qual é representativa do conjunto observado.

Gráfico 5.1 - Variação de temperatura registrada com o sistema de termopares em cada região para a amostra 1 (Canal 0 – Ápice; Canal 1 – Distal; Canal 2 – Mesial; e Canal 3 – Lingual)

Nota-se que as oscilações de temperatura ocorreram a partir do início da irradiação (por volta de 15s), sendo os canais 0 (região do ápice) e 3 (região lingual) os de maior pico. Em alguns espécimes, a região mesial exibiu valores maiores do que a apical, diferindo um pouco do gráfico apresentado, gerando médias maiores (Tabela 5.2). Ao final da irradiação (por volta dos 25s) a temperatura ainda continuou variando, com máxima variação entre os 30 e 35s nos canais 0, 2, 3 (regiões apical, mesial e lingual, respectivamente). Até o final do tempo de medição, as variações continuaram ainda elevadas nas regiões citadas.

As médias da máxima variação de temperatura em cada região e seu respectivo desvio-padrão são apresentados na Tabela 5.2. No Anexo B, os valores de cada amostra são observados individualmente, e no Anexo C é apresentado o gráfico de dispersão.

Tabela 5.2 - Média e incerteza (desvio-padrão) da máxima variação de temperatura registrada em cada região

Região	Média $DT_{\max}$ (°C)	Desvio-padrão (°C)
Ápice	0,68	0,18
Distal	0,43	0,13
Mesial	0,81	0,19
Lingual	3,16	0,66

Verifica-se que a maior variação de temperatura ocorre na região lingual, sendo esta três vezes maior que as variações de temperatura nas demais regiões. Na região do ápice, distal e mesial, as variações registradas são iguais ou inferiores a 1,5°C (Anexo B), tendo como médias valores que não excederam 1°C.

Observa-se um valor do desvio-padrão da média significativo, resultado da diferença do valor da variação de temperatura registrada em uma mesma região de amostra para amostra. Os fatores que podem ter causado essa diferença são: diferença nas posições do termopar, principalmente, e imprecisão na irradiação.

A imprecisão da irradiação se deve a dificuldade do operador do laser em irradiar sempre da mesma forma as diferentes amostras. Para verificar se esse foi o fator que causou a diferença da variação de temperatura em uma mesma região para cada amostra repetiram-se cinco vezes as medidas de temperatura em uma mesma amostra sem alterar a posição dos termopares. As máximas variações de temperatura registradas para cada medida em cada região são apresentadas na Tabela 5.3. Nota-se que a máxima variação de temperatura registrada em cada região varia muito pouco de uma medida para a outra, sendo os desvios-padrão bastante baixos.

Tabela 5.3 - Máximas variações, média e desvio-padrão de temperatura registradas em cada região para cinco medidas em uma mesma amostra

	DT_{max}(°C)			
Medidas	Ápice	Distal	Mesial	Lingual
1	0,31	0,44	0,59	2,30
2	0,38	0,60	0,56	2,36
3	0,32	0,61	0,53	2,13
4	0,43	0,58	0,67	2,24
5	0,47	0,74	0,64	2,58
Média (± DP)	0,38±0,03	0,59±0,05	0,59±0,02	2,32±0,07

As variações máximas de temperatura encontradas para cada região são apresentadas na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Máxima variação de temperatura registrada em cada região

Região	Média $DT_{max}(^{\circ}C)$
Ápice	1,78
Distal	1,18
Mesial	1,60
Lingual	6,69

Observa-se que a maior variação de temperatura foi registrada na região lingual, sendo que esta chega a ser três vezes maior que a máxima variação de temperatura registrada na região distal, que sofreu menor variação.

5.2 Análise qualitativa da expressão imunoistoquímica

Pela análise dos cortes histológicos utilizados na imunoistoquímica e corados em HE , foi possível analisar, além da expressão das proteínas Hsp27 e Hsp47, também o processo inflamatório e reparativo em ambos os grupos. Em 0h, notou-se no grupo laser dano térmico na vertente interna e externa da gengiva marginal vestibular e ausência de exsudato inflamatório (Figura 5.1 - D e Figura 5.4 - D). Este

foi evidente em 24h, quando então se observou intenso edema, infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear e hiperemia na lâmina própria dessa região (Figura 5.2 - B e D). Esses elementos diminuíram consideravelmente em 72h; nesse período observou-se reconstrução parcial das vertentes interna e externa da gengiva marginal vestibular, moderada colagenização na lâmina própria e grande quantidade de vasos sanguíneos (Figura 5.3B). Notou-se também início da formação do epitélio juncional. Em 120h, não se observaram mais elementos teciduais indicativos de reparo, porém as vertentes gengivais e o epitélio juncional ainda não adquiriram sua anatomia original (Figura 5.6B). Não foram observadas alterações nas demais estruturas analisadas. Não se notou sinal de dano térmico ou exsudato inflamatório no tecido pulpar, no ligamento periodontal (em todos os terços) ou na gengiva marginal lingual.

Nos cortes histológicos do grupo bisturi, observou-se início da formação do tecido epitelial da gengiva vestibular já em 24h (Figura 5.2A), diferentemente do grupo laser, a qual foi evidente em 72h. Exsudato inflamatório foi menos intenso do que o grupo laser em 0h e 24h (Figura 5.2 - A e 2). Em 120h, os espécimes exibiram padrão de reparo bastante semelhante ao grupo laser (Figura 5.6).

A expressão imunoistoquímica da Hsp27 exibiu diferentes padrões de acordo com a estrutura e o tempo experimental analisado. Entre os grupos modificou-se somente a intensidade de expressão, cujo resultado encontra-se adiante. A marcação foi citoplasmática ou então extracelular, esta principalmente nas fibras da lâmina própria. Notou-se positividade nas camadas suprabasais epiteliais da gengiva marginal e lingual, nos fibroblastos, tanto pulpares quanto periodontais, nas células

da parede vascular, nos ameloblastos e nos odontoblastos. Em ambos a marcação foi moderada e homogênea, concentrando-se mais na porção apical celular. Nos odontoblastos, observou-se positividade também nos prolongamentos do interior dos túbulos dentinários e na pré-dentina (Figura 5.7 - A). O tecido pulpar exibiu marcação positiva na parede dos vasos sanguíneos e em algumas células mesenquimais. Nas células inflamatórias, observou-se que as de padrão plasmocitário eram positivas para a Hsp27 (Figura 5.2 - D). Não se notou positividade na matriz do osso alveolar e nos osteócitos dessa região, porém os osteoblastos exibiam marcação discreta e os vasos sanguíneos do sistema Havers, marcação mais intensa. Ausência de positividade foi também observada na camada basal do epitélio gengival, a qual tornou-se positiva somente em 72h na gengiva marginal vestibular de ambos os grupos (Figura 5.3 - A e B).

Para a Hsp47, também se observou variação na intensidade de marcação quando se compararam os grupos, mas não se detectaram diferenças quanto ao tipo de estrutura positiva. Em geral, os fibroblastos do ligamento periodontal foram fortemente positivos em praticamente todos os períodos experimentais em ambos os grupos, principalmente aqueles localizados próximos à crista óssea (Figura 5.5 – C e D). Foi observada positividade homogênea e constante para os odontoblastos (Figura 5.7 – B), ameloblastos e pré-ameloblastos, com padrão semelhante ao descrito para a Hsp27. O tecido pulpar não exibiu padrão constante de marcação, havendo positividade nos fibroblastos e em algumas fibras (aparentemente colágenas) do tecido conjuntivo. O epitélio gengival exibiu positividade na camada basal, sendo negativo nas camadas mais superficiais. Notou-se também positividade para as células da parede vascular. Como marcação extracelular, foi evidente a positividade

para as fibras do ligamento periodontal com inserção no osso alveolar ou no cimento (fibras de Sharpey), sendo as fibras mais delgadas ou da região mais central do espaço periodontal marcadas mais fracamente. Tal qual na Hsp27, não se observou positividade para a matriz do osso alveolar, nos osteócitos dessa região, porém houve positividade nos osteoblastos e nos vasos sanguíneos do sistema de Havers.

O Quadro 5.5 contém um resumo das estruturas analisadas e seu padrão de marcação imunoistoquímico (positivo ou negativo) para a Hsp27 e Hsp47.

Estruturas	Hsp27	Hsp47
Fibroblastos do periodonto	+	+
Fibroblastos da polpa	+/-	+/-
Células da parede vascular	+	+
Camada basal do epitélio gengival	+/-	+
Camadas suprabasais do epitélio gengival	+	+/-
Odontoblastos	+	+
Ameloblastos e pré-ameloblastos	+	+
Matriz do osso alveolar	-	-
Osteócitos do osso alveolar	-	-
Osteoblastos do osso alveolar	+	+
Fibras periodontais	+/-	+
Fibras da matriz extracelular do tecido pulpar	+/-	+/-

(+) marcação sempre positiva; (-) marcação sempre negativa;
(+/-) marcação ora positiva ora negativa.

Quadro 5.5-Resumo das estruturas analisadas e seu padrão de marcação imunoistoquímico (positivo ou negativo) para a Hsp27 e Hsp47

5.3 Análise semiquantitativa da expressão imunoistoquímica

A Tabela 5.6 contém a média dos valores da análise semiquantitativa da expressão da Hsp27 para ambos os grupos. A análise dos ameloblastos e do ligamento periodontal foi subdividida nos terços apical, médio e cervical, para se comparar com as medições de variação de temperatura obtidas *in vitro*.

Tabela 5.6 - Média dos valores da análise semiquantitativa para a intensidade de expressão imunoistoquímica da Hsp27 de acordo com as estruturas observadas, os grupos e os períodos experimentais

Estruturas dentárias		0h		24h		72h		120h	
		GB	GL	GB	GL	GB	GL	GB	GL
Gengiva marginal lingual		2,0	1,6	1,0	2,0	0,5	1,6	0,5	1,0
Gengiva marginal vestibular		3,0	2,5	1,6	1,3	1,0	2,0	1,0	3,0
Ameloblastos	Terço cervical	2,0	3,0	1,0	3,0	1,0	2,3	1,0	2,3
	Terço médio	1,5	3,0	1,5	2,5	1,5	2,6	1,5	2,0
	Terço apical	1,5	3,0	1,0	2,5	1,5	2,3	1,5	2,0
Ligamento periodontal (face vestibular)	Terço cervical	1,5	1,0	1,3	2,5	1,5	1,6	0,5	1,3
	Terço médio	1,5	2,0	1,6	2,0	1,0	1,3	1,3	1,3
	Terço apical	1,0	2,0	1,0	1,5	1,0	1,3	1,3	1,3
Ligamento periodontal (face lingual)	Terço cervical	1,5	1,5	1,0	1,5	1,0	1,3	0,5	1,0
	Terço médio	1,0	1,0	1,0	1,5	1,0	1,0	1,0	1,0
	Terço apical	1,0	1,5	1,0	1,5	1,0	1,0	1,0	1,0

GB = grupo com bisturi; GL = grupo com laser; 0 = ausência de marcação; 0,1 a 1,0 = marcação discreta; 1,1, a 2,0 = marcação moderada; 2,1 a 3,0 = marcação intensa.

Essa tabela evidencia que a marcação da Hsp27 foi positiva em todas as estruturas estudadas e em todos os períodos experimentais. Em geral, o grupo com

laser evidenciou expressões mais intensas da Hsp27 em praticamente todas as estruturas, principalmente nos ameloblastos nas primeiras horas, quando a média atingiu grau 3 (intenso) nos três terços. O grupo laser ainda exibiu valores moderados e intensos na gengiva marginal vestibular, principalmente nos tempos de 0h, 72h e 120h. Em 0h e 24h, contudo, esses valores foram inferiores aos observados no grupo bisturi. A gengiva marginal lingual exibiu valores discretos a moderados em todos os períodos analisados. O ligamento periodontal (vestibular e lingual), por sua vez, teve expressão discreta a moderada. Em geral, em todas as estruturas a intensidade da expressão da Hsp27 diminuiu em 120h, com exceção da gengiva marginal vestibular, a qual exibiu expressão intensa nesse período experimental. Com relação aos terços analisados, não houve um padrão constante de intensidade, havendo certa tendência de os terços cervicais serem mais intensos em relação ao médio e apical.

No grupo bisturi, detectou-se expressão intensa somente na gengiva marginal vestibular em 0h. Nas demais estruturas a expressão foi moderada ou discreta em todos os períodos experimentais. Há uma tendência de se manterem ou diminuírem os valores de intensidade de expressão nesse grupo em 120h, inclusive na gengiva marginal vestibular.

As Figuras 5.1 a 5.3 exibem exemplos do padrão de marcação imunoistoquímica para a Hsp27 de acordo com os grupos e o períodos experimentais.

A Tabela 5.7 mostra a média dos valores da análise semiquantitativa para a intensidade de expressão da Hsp47.

Tabela 5.7-Média dos valores da análise semiquantitativa para a intensidade de expressão imunoistoquímica da Hsp47 de acordo com as estruturas observadas, os grupos e os períodos experimentais

Estruturas dentárias		0h		24h		72h		120h	
		GB	GL	GB	GL	GB	GL	GB	GL
Gengiva marginal lingual		1,3	1,5	1,6	1,0	1,0	2,3	1,0	1,3
Gengiva marginal vestibular		2,0	2,0	3,0	1,6	0,6	3,0	1,0	1,3
Ameloblastos	Terço cervical	1,5	1,0	2,3	2,3	1,6	3,0	1,0	2,0
	Terço médio	1,6	2,0	2,3	1,6	1,6	2,3	2,0	2,0
	Terço apical	1,6	2,0	2,3	2,0	1,6	2,6	1,0	2,0
Ligamento periodontal (face vestibular)	Terço cervical	2,3	3,0	3,0	2,0	1,6	3,0	1,5	1,5
	Terço médio	3,0	3,0	2,3	2,0	1,6	3,0	1,5	2,0
	Terço apical	2,0	1,5	2,0	1,3	2,0	2,3	1,0	1,0
Ligamento periodontal (face lingual)	Terço cervical	2,3	2,0	2,0	2,0	1,6	3,0	2,0	2,0
	Terço médio	1,0	1,0	2,0	1,0	1,3	2,0	1,5	1,0
	Terço apical	1,3	1,0	1,5	1,6	1,0	2,3	1,0	1,0

GB = grupo com bisturi; GL = grupo com laser; 0 = ausência de marcação; 0,1 a 1,0 = marcação discreta; 1,1, a 2,0 = marcação moderada; 2,1 a 3,0 = marcação intensa.

Em ambos os grupos observa-se positividade para a Hsp47 em todas as estruturas analisadas. Nota-se que o grupo laser não diferiu muito do grupo bisturi em 0h e 24h nas estruturas em geral. Exibiu inclusive valores menores de expressão na gengiva marginal vestibular em 24h, quando o grupo bisturi exibiu grau 3 como média de intensidade de expressão dessa proteína. Os padrões mais intensos de expressão da Hsp47 no grupo laser encontram-se no período de 72h, quando todas as estruturas exibem valores entre 2,3 e 3 principalmente nos terços cervicais analisados. Em 120h os valores caem para discreto a moderado, sendo os terços apicais bastante discretos.

O grupo bisturi exibiu valores intensos de expressão nos períodos iniciais, principalmente no terço cervical e médio do ligamento periodontal vestibular e na gengival marginal vestibular. Nos períodos de 72h e 120h, em todas as estruturas, os valores de intensidade foram menores do que no grupo laser, tendendo a serem discretos a moderados.

As Figuras 5.4 a 5.6 contêm exemplos do padrão de marcação imunoistoquímica para a Hsp47 de acordo com os grupos e períodos experimentais.

Figura 5.1-Período experimental de 0h. AM – ameloblastos; GMV – gengiva marginal vestibular; GML – gengiva marginal lingual; LPL – ligamento periodontal lingual; AO – osso alveolar; P - polpa **A:** Vista geral do elemento dentário, evidenciando intensa positividade para GMV, AM e P, moderada positividade para LPL e negatividade para a matriz do OA e dentina (EB, 40X). **B:** Vista geral do elemento dentário, evidenciando discreta positividade na face lingual e moderada positividade na face vestibular (EB, 40X). **C:** Gengiva marginal lingual, com positividade somente para os fibroblastos próximos a crista marginal e a dentina (EB, 100X). **D:** Gengiva marginal vestibular, evidenciando intensa positividade em AM e na lâmina própria; na área necrótica indicativa de dano térmico na superfície da gengiva nota-se marcação positiva somente em alguns elementos celulares (EB, 100X)

Figura 5.2-Período experimental de 24h. AM – ameloblastos; PA – pré-ameloblastos; GMV – gengiva marginal vestibular; AO – osso alveolar; LPV – ligamento periodontal vestibular. **A:** GMV evidenciando moderada positividade na camada superficial do epitélio, em fibroblastos e vasos sanguíneos da lâmina própria, a qual exibe intenso infiltrado inflamatório (EB, 100X). **B:** GMV com intensa positividade no epitélio como um todo, nos AM e na lâmina própria, a qual exibe intenso edema e infiltrado inflamatório (EB, 100X). **C:** AM com moderada positividade e intensa marcação em LPV (EB, 400X). **D:** PA com intensa marcação e lâmina própria exibindo moderada a intensa positividade para a parede vascular e células plasmocitárias (seta) (EB, 400X)

Figura 5.3 - Período experimental de 72h (A e B) e 120h (C e D). AM – ameloblastos; GMV – gengiva marginal vestibular; GML – gengiva marginal lingual; AO – osso alveolar; P - polpa. **A:** GML com discreta positividade na camada superficial do epitélio e nos vasos sanguíneos da lâmina própria (EB, 100X). **B:** GMV com adiantado processo reparativo e intensa positividade no epitélio em formação, em AM e na pré-dentina em P. O processo reparativo no grupo bisturi é semelhante nesse período (EB, 100X). **C:** GMC praticamente refeita, exibindo intensa positividade na vertente interna e fraca positividade em AM. No grupo laser, a GMV exibia características semelhantes quanto ao reparo (EB, 100X). **D:** GML exibindo positividade somente nas camadas superficiais do epitélio e em algumas células da lâmina própria (EB, 100X)

Figura 5.4 - Período experimental de 0h. AM – ameloblastos; GMV – gengiva marginal vestibular; GML – gengiva marginal lingual; AO – osso alveolar. **A:** Vista geral do elemento dentário em que se evidencia intensa positividade, principalmente no ligamento periodontal e em AM (EB, 40X). **B:** Vista geral do elemento dentário exibindo moderada positividade (EB, 40X). **C:** Detalhe da GMV em que se nota positividade intensa em AM, no epitélio como um todo e nas células da lâmina própria e do ligamento periodontal (EB, 100X). **D:** Detalhe de GMV, evidenciando área extensa de necrose superficial (*) sem positividade. AM exibindo moderada positividade e o ligamento periodontal, moderada a intensa positividade (EB, 100X)

Figura 5.5 - Período experimental de 24h (A e B) e 72h (C e D). AM – ameloblastos; GMV – gengiva marginal vestibular; GML – gengiva marginal lingual; AO – osso alveolar; LP – ligamento periodontal. **A:** GMV evidenciando marcação moderada na lâmina própria e em AM; em P nota-se marcação discreta em odontoblastos e em alguns fibroblastos (EB, 100X). **B:** Vista geral do elemento dentário exibindo discreta positividade na face lingual e moderada na face vestibular (EB, 40X). **C:** GML evidenciando o padrão de marcação positivo em LP, com intensidade maior nos fibroblastos ao redor de AO (seta) (EB, 100X). **D:** Intensa positividade principalmente em LP como um todo e na lâmina própria de GML (EB, 100X)

Hsp47 - Grupo bisturi

Hsp47 - Grupo laser

Figura 5.6 - Período experimental de 120h. GMV – gengiva marginal vestibular. **A e B:** Reparo da gengiva praticamente finalizado, com recuperação parcial do epitélio juncional. Nota-se intensidade de marcação semelhante em ambos os grupos, com positividade para os fibroblastos do ligamento periodontal e para os queratinócitos da camada basal do epitélio de GMV (EB, 100X)

Figura 5.7 - Padrão de marcação imunoistoquímica para Hsp27 (A) e para Hsp47 (B) para os odontoblastos. Em ambos os grupos a marcação foi semelhante. **A:** Intensa positividade nos odontoblastos e em alguns pré-odontoblastos, na pré-dentina (PD) e nos prolongamentos odontoblásticos localizados nos túbulos dentinários (seta) (Grupo bisturi, EB, 400X). **B:** Moderada positividade nos odontoblastos e na PD (Grupo laser, EB, 400X)

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliaram-se as modificações de temperatura geradas pelo laser de diodo durante gengivoplastia, bem como a expressão imunoistoquímica da Hsp27 e da Hsp47 no tecido periodontal. O intuito foi verificar possíveis alterações dessa expressão nos espécimes irradiados em relação ao mesmo procedimento com bisturi convencional, admitindo que o laser utilizado gera calor e este poderia provocar maior expressão das proteínas citadas. Estas consensualmente sinalizam estresse celular provocado por aumento de temperatura. Optou-se por essas duas proteínas de choque térmico por estarem relacionadas com diferenciação/migração celular e inibição de apoptose (Hsp27), e com produção de colágeno (Hsp47), aspectos fundamentais para a análise do reparo gengival.

O Laser de Diodo possui indicações precisas para tecido moles orais, como aplicações em cirurgias em tecidos gengivais/periodontais. Adams e Pang (2004), Coletton (2004) e Moritz et al. (1998) e relatam sucesso nessa aplicação, sem efeitos danosos para os tecidos dentais. No presente experimento, também não foram observadas alterações nos tecidos adjacentes ao local irradiado que pudessem prejudicar o processo reparativo da gengiva marginal, nem tampouco sinais de dano térmico no ligamento periodontal, no tecido pulpar ou nos tecidos mineralizados. Foi observada completa ou adiantada reparação da gengiva, tanto em termos clínicos quanto histológicos em 72h de pós-operatório, não havendo distinção do grupo

submetido a gengivoplastia com bisturi convencional. Esses achados corroboram os relatos por Damante et al. (2004).

Segundo relato na literatura, o aumento de temperatura provocado pelo laser de diodo em gengivoplastia fica em torno de 3°C (FONTANA et al., 2004). Em outras situações clínicas, no interior da polpa foi observado aumento semelhante (ARRASTIA et al., 1994). No ensaio clínico *in vitro* do presente trabalho, observaram-se variações médias semelhantes, com variações máximas entre 1,18°C no ponto mais distante da irradiação e 6,69°C no ponto mais próximo (região lingual). Esta, visível nos cortes histológicos analisados, não evidenciou sinais de necrose ou de coagulação protéica na matriz extracelular. No ponto de irradiação (região vestibular), foi evidente necrose restrita aos limites cirúrgicos, tal qual relatado por Janda et al. (2003). Essa necrose não atrasou a regeneração completa da gengiva marginal, porém pode ter sido responsável pelo exsudato inflamatório mais intenso em relação ao grupo com bisturi. D´Arcângelo et al. (2007) também verificaram inflamação mais intensa ao compararem laser de diodo com bisturi convencional.

As variações de temperatura foram medidas em quatro locais em relação ao ponto de irradiação. Verificou-se grande variação na medição de espécime para espécime no mesmo local, fato que justificou a necessidade de se verificar a influência do operador na manipulação do laser. Ao se analisar individualmente essa variável, notou-se que a grande incerteza encontrada quando se levaram em consideração as oito amostras não foi devido à imprecisão da irradiação, mas sim à dificuldade de se posicionarem e se manterem os termopares na mesma posição relativa. Sabendo desse fato, optou-se por considerar como a máxima variação de

temperatura em cada região como sendo a máxima variação de temperatura registrada em qualquer uma das oito amostras. Dessa forma, considerou-se no modelo a pior condição de variação para os tecidos biológicos analisados, a qual, pela análise efetuada, foi compatível com regeneração gengival adequada.

As relações da expressão das HSPs com essas variações segundo o local de medição só foram possíveis nas regiões lingual e apical, uma vez que a distal e a mesial não são visíveis nos cortes histológicos. Estes foram estabelecidos para a visualização prioritariamente da face vestibular, na qual foi retirada a gengiva marginal. Assim, realizaram-se cortes longitudinais do tecido dentário no sentido vestibulo-lingual.

O calor gerado não alterou a expressão da Hsp27 e da Hsp47 no tocante às estruturas dentárias positivas e negativas. Os elementos teciduais positivos e negativos para ambas as proteínas foram os mesmos comparando-se o laser e o bisturi convencional. Observaram-se somente variações cronológicas de intensidade da expressão.

A expressão da Hsp27 foi mais intensa a partir de 24h no grupo laser, mantendo-se assim até o período de 120h. O terço cervical da face vestibular, em termos gerais, exibiu valores intensos de expressão considerando-se principalmente os ameloblastos (localizados vestibularmente) e o ligamento periodontal comparativamente ao presente na face lingual. Admitindo que a face lingual teve aumento médio de 3,16°C, a face vestibular irradiada pode ter tido, no mínimo, aumento igual ou maior que este, o que justificaria, em parte a maior expressão da Hsp27 nessa face. Além do efeito do calor, não se pode desconsiderar que a Hsp27

pode ser ativada também por citocinas inflamatórias (HARADA et al., 2008), as quais já estavam presentes em 24h e restritas a essa face. Esse fato justifica a expressão discreta a moderada da Hsp27 no grupo bisturi, o qual também exibiu exsudato inflamatório devido à gengivoplastia realizada.

O incisivo central do rato, na ausência de qualquer agressão, exibe expressão discreta de HSPs de peso molecular reduzido (por exemplo Hsp25) nos nervos e vasos da polpa (SUZUKI et al., 2004). Durante a odontogênese e nos incisivos centrais do rato adulto, os quais exibem constante amelogênese e dentinogênese, essas proteínas exibem intensa expressão nos odontoblastos e ameloblastos (HARADA et al., 2008; OHSHIMA et al., 2000, 2002). Pode-se dizer, então, que a inflamação gerada pela gengivoplastia acarretou modificações na expressão da Hsp27 tanto no grupo laser quanto no grupo bisturi, havendo positividade, além das estruturas citadas, no epitélio da gengiva marginal, nos fibroblastos do ligamento periodontal e da lâmina própria gengival e dos vasos sanguíneos nessa região. Em termos gerais, pode-se interpretar essa expressão como reflexo dos estímulos de proliferação e migração celular principalmente dos queratinócitos e das células da parede vascular. Como a expressão aumentada da Hsp27 está relacionada com a manutenção e controle da actina do citoesqueleto (HIRANO; SHELDEN; GILMONT, 2004), assim como com a inibição da apoptose (GARRIDO, 2001), as células citadas produzem maior quantidade de Hsp27 diante da agressão inflamatória para evitar sua apoptose, bem como para manter a actina do seu citoesqueleto, agilizando sua migração após a proliferação. Além desses aspectos, estudos têm demonstrado que a maior expressão da Hsp25 e Hsp27 nos odontoblastos e nos ameloblastos relaciona-se também com maior taxa de diferenciação dessas células, garantindo a

integridade da matriz dos tecidos mineralizados dentais (HARADA et al., 2008; OHSHIMA, 2000, 2002).

Considerando esses aspectos para o grupo laser, no qual a expressão da Hsp27 foi intensa em vários momentos e estruturas analisadas, pode-se depreender que esses fenômenos estejam mais ativados, o que compensaria atrasos de reparo devido à área necrótica presente no tecido irradiado, a ponto de a regeneração se igualar ao grupo bisturi.

A maior intensidade de expressão da Hsp27 pôde ser vista na região vestibular do grupo laser, contudo não se pode dizer o mesmo das regiões lingual e apical do mesmo grupo. A região lingual, sabidamente com aumento de temperatura maior do que a apical, não exibiu maior intensidade de expressão da Hsp27 do que a região apical em todos os momentos analisados do grupo laser. Isso pode ser devido ao fato de as estruturas analisadas nessas regiões diferirem bastante no padrão de expressão (por exemplo, o padrão de expressão no epitélio gengival é naturalmente diferente do padrão do ligamento periodontal na região apical) ou mesmo que o calor gerado não necessariamente foi suficiente para gerar padrões distintos quando se analisam espécimes do mesmo grupo.

Considerando agora a expressão imunoistoquímica da Hsp47, nota-se que o grupo bisturi exibiu padrão mais intenso em relação ao grupo laser nos períodos iniciais. A maior expressão da Hsp47 no grupo laser foi tardia, ou seja, a partir de 72h. A Hsp47 atua no controle de qualidade do procolágeno, garantindo a integridade deste (NAGATA, 1996, 1998), sendo portanto observada principalmente em fibroblastos. A ausência de tecido necrótico no grupo bisturi favoreceu um pico

de expressão de Hsp47 em 24h, quando então já foi acionado o mecanismo de reconstrução da lâmina própria juntamente com o do epitélio. Já no grupo laser, nessa fase a retirada do tecido necrótico estava no auge, havendo estímulo fibroblástico somente a partir de 72h, sendo este bastante intenso e superior até mesmo aos padrões encontrados em 0h e 24h no grupo bisturi. Esse fato, aliado ao aspecto de que o laser é naturalmente estimulador da fibrogênese por sua ação fotoquímica (TAYLOR et al., 1997), pode explicar a expressão tardia e intensa dessa proteína.

Seguindo a regra da Hsp27, a Hsp47 também exibiu maior intensidade de expressão na região vestibular considerando o grupo laser individualmente. Assim, pelo mesmo raciocínio, pode-se depreender que o aumento do calor foi o responsável por essa expressão. No ligamento periodontal, essa tendência é particularmente mais marcante, uma vez que há maior quantidade de fibroblastos, as células que mais homogeneamente expressam a Hsp47. A maior intensidade de expressão da Hsp47 está relacionada à maior produção de colágeno, tanto pelos fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal (COLETTA et al., 1999; YOSHIMATSU, UEHARA; YOSHIDA, 2008) quanto pelos odontoblastos (SHROFF et al., 1993). Os ameloblastos também expressaram intensivamente a Hsp47, fato interessante haja visto que, em situações sem agressão ou mesmo durante a amelogênese ou odontogênese, essa expressão seja nula ou bastante discreta. Assim, a intensa expressão no grupo laser pode indicar que, também nos ameloblastos, seja ativado o mecanismo protetor do sistema de colágeno, garantindo a integridade da matriz de esmalte.

Comparando-se a região cervical da face lingual com as regiões apicais do grupo laser, nota-se que a expressão da Hsp47 foi maior na região lingual. Isso pode ser devido ao aumento maior do calor nessa região em comparação à região apical, mas também, tal qual na Hsp27, pode ser devido à particularidade de padrão de expressão da Hsp47 dependendo da região anatômica. De maneira geral, a Hsp47 era mais intensivamente expressa nos fibroblastos ao redor da crista marginal em ambos os grupos, independentemente de ter havido, portanto, aumento da temperatura. Assim, acreditamos que a maior expressão da Hsp47 na região lingual em relação a apical no grupo laser seja muito mais devido à biologia de proteção do ligamento periodontal próximo à crista do que propriamente ao maior aumento de calor.

Foi comentado que a ativação das HSPs é oriunda de diversos tipos de agressão, sendo os pertinentes a este trabalho o aumento do calor e a inflamação. Contudo, não se pode deixar de discutir os efeitos fotoquímicos do laser de diodo, mesmo utilizado em alta intensidade. A energia excedente após o corte do tecido interage com as células; o laser de diodo no comprimento de onda do infravermelho próximo (810nm) interage com as mitocôndrias e com as membranas celulares levando à maior atividade celular e maior síntese de proteínas, o que ativa as HSPs; além disso também há maior estresse oxidativo, que também aumenta a produção das HSPs (KARU; KOLYAKOV, 2005).

Pode-se afirmar que o laser de diodo, nos parâmetros estipulados, provocou aumento do calor local durante a gengivoplastia. Esse calor, dentre outros efeitos do laser, foi responsável por expressão mais intensa da Hsp27 e da Hsp47 no tecido

periodontal em relação ao procedimento realizado com bisturi convencional, sendo portanto acionado um mecanismo de defesa celular contra essa agressão. O estresse celular gerado, contudo, favoreceu um reparo adequado da estrutura gengival, proporcionando regeneração semelhante da gengiva marginal ao se compararem os dois grupos.

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho sugere as seguintes conclusões:

1. O laser de diodo, nos parâmetros estabelecidos na presente pesquisa, gerou aumento de temperatura local que não excedeu 7°C nas regiões vizinhas, não acarretando danos irreversíveis celulares nessas regiões.
2. No ponto de irradiação (região vestibular), foi observado dano térmico restrito à área irradiada, porém este não acarretou atraso no processo reparativo em relação ao bisturi convencional.
3. O aumento de temperatura foi relacionado ao aumento da expressão imunistoquímica da Hsp27 e da Hsp47 no ponto de irradiação (região vestibular).
4. O grupo bisturi exibiu intensidade maior de expressão da Hsp27 e da Hsp47 e positividade em células em locais não comumente observados.
5. Em relação ao grupo bisturi, o grupo laser exibiu intensidade maior de expressão da Hsp27 em todos os períodos experimentais de uma maneira geral.
6. O grupo laser exibiu intensidade maior de expressão da Hsp47 em períodos mais tardios comparativamente ao grupo bisturi.
7. O aumento da expressão da Hsp27 e da Hsp47 em ambos os grupos condiz com o processo reparativo normal observado, indicando que a célula, sob estresse inflamatório gerado pela gengivoplastia e ou fototérmico gerado pelo

laser, responde com estimulação de migração, diferenciação e produção de colágeno.

REFERÊNCIAS¹

Adams TC, Pang PK. Lasers in aesthetic dentistry. Dent Clin North Am 2004;48(4):833-60.

Anfisen CB. Principles that govern the folding of protein chains. Science 1973;8:223-30.

Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. Periodontology 2000 2006;36:59-97.

Arrastia AM, Machida T, Smith PW, Matsumoto K. Comparative study of the thermal effects of four semiconductor lasers on the enamel and pulp chamber of a human tooth. Lasers Surg Med 1994;15(4):382-9.

Coletta RD, Almeida OP, Ferreira LR, Reynolds MA, Sauk JJ. Increase in expression of Hsp47 and collagen in hereditary gingival fibromatosis is modulated by stress and terminal procollagen N-propeptides. Connect Tissue Res 1999;40(4):237-49.

Coleton S. Lasers in surgical periodontics and oral medicine. Dent Clin N Am 2004;48:937-62.

Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. J Clin Periodontol 1996;23:492-6.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Damante CA, Gregghi SL, Sant Ana AC, Passanezi E, Taga R. Histomorphometric study of the healing of human oral mucosa after gingivoplasty and low-level laser therapy. *Lasers Surg Med* 2004;35:377–84.

D'Arcangelo C, Di Nardo Di Maio F, Prosperi GD, Conte E, Baldi M, Caputi S. A preliminary study of healing of diode laser versus scalpel incisions in rat oral tissue: a comparison of clinical, histological, and immunohistochemical results. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103(6):764-73.

Horch H-H, Deppe H. Lasers in oral and maxillofacial surgery. *Med Laser Appl* 2005;20:47–59.

Fontana CR, Kurachi C, Mendonça CR, Bagnato VS. Temperature variation at soft periodontal and rat bone tissues during a medium-power diode laser exposure. *Photomed Laser Surg* 2004;22(6):519-22.

Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 2006;5:2592–601.

Gutknecht N, Franzen R. O laser: função, interação e segurança. In: Gutknecht N, Eduardo CP. *Odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica*. São Paulo: Quintessence; 2004. cap. 3, p.25-60.

Harada M, Kenmotsu S, Nakasone N, Nakakura-Ohshima K, Ohshima H. Cell dynamics in the pulpal healing process following cavity preparation in rat molars. *Histochem Cell Biol* 2008;130(4):773-83.

Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002;295(5561):1852-8.

Hirano S, Shelden EA, Gilmont RR. HSP27 regulates fibroblast adhesion, motility, and matrix contraction. *Cell Stress Chaperones* 2004;9(1):29-37.

Janda P, Sroka R, Mundweil B, Betz CS, Baumgartner R, Leunig A. Comparison of thermal tissue effects induced by contact application of fiber guided laser systems. *Lasers Surg Med* 2003;33(2):93-101.

Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg* 2005;23(4):355-61.

Kovalchin JT, Wang R, Wagh MS, Azoulay J, Sanders M, Chandawarkar RY. In vivo delivery of heat shock protein 70 accelerates wound healing by up-regulating macrophage-mediated phagocytosis. *Wound Repair Regen* 2006;14(2):129-37.

Kreisler M, Al-Haj H, D'Hoedt B. Intrapulpal temperature changes during root surface irradiation with an 809-nm GaAlAs laser. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93(6):730-5.

Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S, Shimabukuro T, et al. Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 1996;128(3):251-8.

Leonardi R, Pannone G, Magro G, Kudo Y, Takata T, Lo Muzio L. Differential expression of heat shock protein 27 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2002;9(2):261-6.

Leonardi R, Barbato E, Paganelli C, Lo Muzio L. Immunolocalization of heat shock protein 27 in developing jaw bones and tooth germs of human fetuses. *Calcif Tissue Int* 2004;75(6):509-16.

Lowe AS, Walker MD, Byrne MO, Baxter GD, Hirst DG. Effect of low intensity monochromatic light therapy (890nm) on a radiation impaired, wound-healing model in murine skin, *Lasers Surg Med* 1998;23:291–8.

Mc Nally K, Gillings B, Dawes J. Laser-dye ablation technique for removal of carious dentin and enamel. *Proceedings of the Lasers in Dentistry III. Progress in Biomedical Optics*; 1997. Feb. 8-9; San Jose, California. SPIE 1997;2973:62-73.

Moritz A, Schoop U, Goharkhay K, Schauer P, Doertbudak O, Wernisch J, et al. Treatment of periodontal pockets with a diode laser. *Lasers Surg Med* 1998;22(5):302-11.

Nagata K. Expression and function of Heat Shock Protein 47: A collagen-Specific Molecular Chaperone in the Endoplasmatic Reticulun. *Matrix Biol* 1998;16(7):379-86. Review.

Nagata K. Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone. *Trends Biochem Sci* 1996;21(1):22-6.

Nagata K, Yamada KM. Phosphorylation and transformation sensitivity of a major collagen-binding protein of fibroblasts. *J Biol Chem* 1986;261(16):7531–6.

Ohshima H, Ajima H, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Wakisaka S, Maeda T. Transient expression of heat shock protein (Hsp)25 in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in the rat incisor. *Arch Histol Cytol* 2000;63(4):381-95.

Ohshima H, Nakakura-Ohshima K, Maeda T. Expression of heat-shock protein 25 immunoreactivity in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in the rat molar. *Connect Tissue Res* 2002;43(2-3):220-3.

Otsuka Y, Nakakura-Ohshima K, Noda T, Maeda T, Ohshima H. Possible role of heat shock protein (Hsp) 25 in the enamel organ during amelogenesis in the rat molar. *Arch Histol Cytol* 2001;64(4):369-78.

Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:505–12.

Romanos GE, Henze M, Banihashemi S, Parsanejad HR, Winckler J, Nentwig GH. Removal of epithelium in periodontal pockets following diode (980 nm) laser application in the animal model: an in vitro study. *Photomed Laser Surg* 2004;22(3):177-83.

Salminen WF, Voellmy R, Roberts SM. Protection against Hepatotoxicity by a single dose of amphetamine: The potential role of heat shock protein induction. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;147:247–58.

Sens DA, McGuirt JP, Khan W, Todd JH, Howell RM. Expression of heat shock protein 27 in adult human third molar dental pulp. *J Oral Pathol Med* 1996;25(7):382-7.

Shroff B, Smith T, Norris K, Pileggi R, Sauk JJ. Hsp 47 is localized to regions of type I collagen production in developing murine femurs and molars. *Connect Tissue Res* 1993;29(4):273-86.

Sulieman M, Rees JS, Addy M. Surface and pulp chamber temperature rises during tooth bleaching using a diode laser: a study in vitro. *Br Dent J* 2006;200(11):631-4.

Sumioka I, Matsura T, Kai M, Yamada K. Potential roles of hepatic heat shock protein 25 and 70i in protection of mice against acetaminophen-induced liver injury. *Life Sci* 2004;74:2551–61.

Suzuki T, Nomura S, Maeda T, Ohshima H. An immunocytochemical study of pulpal responses to cavity preparation by laser ablation in rat molars by using antibodies to heat shock protein (Hsp) 25 and class II MHC antigen. *Cell Tissue Res* 2004;315(3):311-9.

Tate Y, Yoshida K, Yoshida 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. *Eur J Oral Sci* 2006;114(1):50-7.

Taylor DL, Schafer SA, Nordquist R, Payton ME, Dickey DT, Bartels KE. Comparison of a high power diode laser with the Nd:YAG laser using in situ wound strength analysis of healing cutaneous incisions. *Lasers Surg Med* 1997;21(3):248-54.

Tolson JK, Roberts SM. Manipulating heat shock protein expression in laboratory animals. *Methods* 2005;35(2):149-57.

Tsan MF, Gao B. Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol Immunol* 2004;1(4):274-9.

Yoshimatsu M, Uehara M, Yoshida N. Expression of heat shock protein 47 in the periodontal ligament during orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol* 2008;53(9):890-5.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****PARECER DE APROVAÇÃO
PROTOCOLO nº 09/08**

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, **APROVOU** o protocolo de pesquisa **“Expressão imuno-histoquímica da Hsp 47 no órgão dentário e suas relações com proteínas da matriz extracelular em tecido irradiado com Laser de Diodo”**, de responsabilidade do pesquisador Marco Aurélio Verlangieri Alves sob orientação do Professora Doutora Luciana Corrêa.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01(um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em “cd” ou “disquete” ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 29 de setembro de 2008.

Prof. Dr. **CELSON LUIZ CALDEIRA**

PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP

ANEXO B - Variações de temperatura máxima registradas para as oito amostras em cada uma das regiões

Amostras	DT _{max} (°C)			
	Ápice	Distal	Mesial	Lingual
1	0,77	0,12	0,28	1,26
2	0,87	1,18	0,9	2,53
3	0,75	0,72	0,68	3,06
4	0,52	0,38	1,59	6,69
5	0,26	0,34	0,56	1,59
6	0,18	0,09	0,25	5,32
7	1,78	0,2	1,6	2,54
8	0,31	0,44	0,59	2,3

Os valores de máximas de variações de temperatura registrados em cada região para cada uma das amostras são apresentados no Anexo B.

ANEXO C - Máxima variação de temperatura registrada em cada região para cada amostra
(Canal 0 – Ápice; Canal 1 – Distal; Canal 2 – Mesial; e Canal 3 – Lingual)

Verifica-se uma grande dispersão dos valores de máxima variação de temperatura registrados em uma mesma região de amostra para amostra, conforme ilustrado no Anexo C.