

AÉCIO ABNER CAMPOS PINTO JÚNIOR

**PENETRAÇÃO E ALTERAÇÕES TECIDUAIS DO LASER DE ALTA
INTENSIDADE EM TECIDOS MOLES E DUROS DA CAVIDADE
BUCAL**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2018**

Aécio Abner Campos Pinto Júnior

**PENETRAÇÃO E ALTERAÇÕES TECIDUAIS DO LASER DE ALTA
INTENSIDADE EM TECIDOS MOLES E DUROS DA CAVIDADE
BUCAL**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia - área de concentração em Estomatologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa de Fátima Bernardes

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Alves Mesquita

Belo Horizonte

2018

Ficha Catalográfica

P659p Pinto Júnior, Aécio Abner Campos.
2018 Penetração e alterações teciduais do laser de alta
T intensidade em tecidos moles e duros da cavidade bucal /
Aécio Abner Campos Pinto Júnior. -- 2018.

65 f. : il.

Orientadora: Vanessa de Fátima Bernardes.
Coorientador: Ricardo Alves Mesquita.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Lasers. 2. Lasers semicondutores. 3. Cistos odontogênicos. 4. Epitélio. 5. Tecido conjuntivo. I. Bernardes, Vanessa de Fátima. II. Mesquita, Ricardo Alves. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Penetração e alterações teciduais do laser de alta potência em tecidos moles e duros da cavidade bucal.

AÉCIO ABNER CAMPOS PINTO JÚNIOR

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre, área de concentração Estomatologia.

Aprovada em 13 de julho de 2018, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Vanessa de Fátima Bernardes - Orientadora
FO-UFMG

Prof(a). Ricardo Alves de Mesquita - Coorientador
FO-UFMG

Prof(a). Wagner Henriques de Castro
FO-UFMG

Prof(a). Júlio César Tanos de Lacerda
Centro Universitário Newton Paiva

Belo Horizonte, 13 de julho de 2018.

Dedico este trabalho à memória de meus pais. Por todo o amor que emana de nossa família, por tudo que construíram, pelo dom da vida que me deram e pelo ser humano que criaram. Ao meu amado pai, meu exemplo de honestidade, bondade, dedicação e caráter. A você, devo tudo que sou! Quaisquer palavras que tentem expressar toda minha gratidão, amor e orgulho jamais serão suficientes. À minha amada mãe, desde muito cedo meu anjo da guarda, agradeço à minha vida, por todas as bênçãos e por sua luz a guiar os meus passos.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e pela saúde que me proporciona e por me possibilitar iniciar e concluir mais esta etapa.

À minha esposa, minha melhor amiga, Ana Luiza. Por seu olhar sempre atento, seu sorriso contagiante, sua sensatez única e por estar ao meu lado (e me apoiar) em todos os momentos. Amo você!

Aos meus familiares e amigos pela torcida e apoio constantes. Aos meus orientadores, Vanessa e Ricardo, por compartilhar suas experiências e conhecimentos, pela confiança (em mim depositada) e pelo suporte irrestrito. A todos os professores e mestres, pelos ensinamentos e referências profissionais. Aos colegas e amigos de graduação e pós-graduações que fizeram e fazem parte de minha trajetória profissional e acadêmica.

Em especial agradeço: Prof. Lucas Abreu, Prof^a. Tarcília Silva, Prof^a. Ivana Diniz, Prof^a. Clésia Nascentes, Prof. Walter Motta, Joanna Farias, Mariana Saturnino, Juliana Sampaio, Camila Kato, Bruno Parpinelli, André Araújo, Felipe Norberto, aos amigos do laboratório de Patologia da FO-UFMG e da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa (UFMG), sobretudo ao Sr. Douglas Silva.

Finalmente, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio ao nosso projeto. E a todos que contribuíram para a concretização deste trabalho.

Muito obrigado!

“Não vês que somos viajantes?

E tu me perguntas:

Que é viajar?

Eu respondo com uma palavra: é avançar!

Experimentais isto em ti

Que nunca te satisfaças com aquilo que és

Para que sejas um dia aquilo que ainda não és.

Avança sempre! Não fiques parado no caminho.”

RESUMO

O tratamento de diversos cistos e tumores odontogênicos muitas vezes é associado a terapias adjuvantes que visam minimizar as taxas de recidivas e otimizando o prognóstico. Muitos são os métodos estão disponíveis na literatura, porém a laserterapia de alta intensidade ainda não foi amplamente estudada sob esse âmbito. A palavra "LASER" é um acrônimo de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation. A utilização de lasers na odontologia tem sido reconhecida na literatura e tornou-se uma ferramenta importante dentre as opções terapêuticas dos cirurgiões-dentistas. O uso dos lasers evoluiu consideravelmente nos últimos anos e, atualmente, existe uma grande variedade de equipamentos utilizados com sucesso para várias situações clínicas. O laser diodo é um deles e possui várias aplicações dentro da Odontologia. A literatura sobre esse tipo de laser é vasta, mas não há consenso quanto à penetração do laser diodo em diferentes tecidos e as alterações teciduais causadas por essa radiação. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos teciduais e a penetração do laser diodo em tecidos mole e ósseo de coelhos Nova Zelândia e investigar se os resultados obtidos podem contribuir para a utilização desta terapia no tratamento de lesões da cavidade bucal. Foi realizado um ensaio clínico experimental com 18 animais ex vivo. Após a eutanásia, foram obtidas amostras de tecido mole da mucosa jugal e tecido ósseo mandibular de cada animal, sempre em bilateralidade. Após a obtenção dos tecidos, foram realizadas demarcações das áreas que seriam submetidas à aplicação do laser diodo, ajustado em 4,5W, em tempos diferentes (G1 e G2). Foram obtidas 08 amostras de tecido mole e 08 amostras de tecido ósseo, de cada grupo (G1 e G2). Essas amostras foram analisadas histologicamente. A análise descritiva dos tecidos moles revelou que os tecidos moles submetidos à ação do laser em tempo maior (G2) apresentaram maior dano tecidual. A profundidade média de penetração do laser nos tecidos ósseos foi de 13,52 μm (G1) e de 10,32 μm (G2). A análise estatística dos tecidos duros não revelou diferença significativa ($p = 0,123$) em relação à profundidade de penetração da radiação laser entre as diferentes intensidades de aplicação do laser.

Palavras-chave: Lasers. Lasers semicondutores. Cistos odontogênicos. Epitélio. Tecido conjuntivo. Osso.

ABSTRACT

Penetration and tissue changes caused by high intensity level laser on soft and hard tissues of the mouth

The treatment of several odontogenic cysts and tumors is commonly associated with an adjuvant therapy, aiming for lower recurrence rates and a better prognosis. There are some related methods however, to our knowledge, the high intensity lasertherapy was not studied fully on this matter. "LASER" is an acronym for Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation. The use of laser in Dentistry is being recognized in the literature and become a useful therapeutic tool among professionals. This technology has evolved considerably over the past few years and nowadays a wide variety of laser types of equipment is being used for several purposes. The diode laser is one of this emerging tool e has great applicability in Dentistry. The literature about this type of laser is wide but there is no consensus about its penetration in different tissues, as well as the effects caused by laser-tissue interaction, are not fully understood. The aim of this study was to evaluate the laser effects on tissues and its penetration in both soft and hard tissues of New Zealand rabbits, in order to investigate if the results could contribute for using this therapy on mouth lesions treatment. It was realized an experiment with 18 animals ex vivo. After the euthanasia, the samples of oral mucosa and mandibular bone, bilaterally, were acquired. The tissues were marked in areas for receiving the laser therapy in two different periods (G1 and G2). The equipment was set in 4.5W. It was obtained 08 samples of each irradiated tissue for histological evaluation. Descriptive analysis revealed that soft tissues of G2 (higher energy of laser) presented bigger tissue damage. The depth of laser penetration on the bone tissue was analyzed and resulted in measurements of 13,52 μm (G1) and 10,32 μm (G2). Statistical analysis of bone samples did not reveal a significant difference ($p = 0,123$) between G1 and G2 regarding laser penetration on evaluated tissues.

Keywords: Lasers. Lasers, Semiconductors. Odontogenic cysts. Epithelium. Connective tissue. Bone.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Dissecção da mucosa jugal..... | 26 |
| Figura 2 - Dissecção do osso mandibular..... | 26 |
| Figura 3 - Delimitação das mucosas jugais para demarcação (com <i>punch</i>) da área a ser irradiada..... | 27 |
| Figura 4 - Perfuração do osso mandibular, com broca cilíndrica 2.8 mm, para demarcação da área a ser irradiada..... | 27 |
| Figura 5 - Tecidos ósseo e mole prontos para receber a radiação laser..... | 28 |
| Figura 6a - Aplicação do laser até atingir o parâmetro clínico de escurecimento do osso..... | 29 |
| Figura 6b - Vista aproximada da aplicação do laser sobre o tecido ósseo..... | 29 |
| Figura 7 - Delimitação distal para secção do osso mandibular..... | 30 |
| Figura 8 - Corte histológico (aumento 40x) do tecido mole, corado em Hematoxilina e Eosina (HE), representando o controle negativo..... | 35 |
| Figura 9 - Corte histológico (aumento 100x) do tecido mole, corado em Hematoxilina e Eosina (HE), representando o dano tecidual grau 1..... | 36 |
| Figura 10 - Corte histológico (aumento 100x) do tecido mole, corado em HE, representando o dano tecidual grau 2..... | 37 |
| Figura 11 - Corte histológico (aumento 100x) do tecido mole, corado em HE, representando o dano tecidual grau 3 (quadro amarelo) e grau 2 (setas brancas.... | 38 |
| Figura 12 - Corte histológico (aumento 100x) do tecido mole, corado em HE, representando o dano tecidual grau 4..... | 39 |
| Figura 13 - Corte histológico (aumento 100x) do tecido mole, corado em HE, representando o dano tecidual grau 5..... | 40 |
| Figura 14a - Corte histológico (aumento 40x) do tecido ósseo, corado em HE, representando a perfuração realizada com broca 2.8 mm..... | 43 |

Figura 14b - Corte histológico (aumento 100x) do tecido ósseo, corado em HE, evidenciando as medidas às margens do tecido ósseo, indicando dano tecidual pelo laser (G1).....43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Distribuição das amostras de tecidos moles, considerando o grau de dano tecidual causado pelo laser.....34
- Tabela 2** - Dados das energias aplicadas sobre os tecidos moles, no momento da aplicação do laser. Dosimetria média: 96,37J41
- Tabela 3** - Dados das energias aplicadas sobre os tecidos ósseos, no momento da aplicação do laser. Dosimetria média: 74,18J.....42
- Tabela 4** - Medida de profundidade de penetração do laser diodo. Medidas obtidas através da avaliação microscópica do dano tecidual causado pela ação do laser diodo sobre os tecidos ósseos de coelhos Nova Zelândia.....44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVMA - *American Veterinary Medical Association*

CO - Ceratocisto Odontogênico

CO₂ - Dióxido de Carbono

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

EPIs - Equipamentos de Proteção Individual

Er: YAG - laser de Érbio YAG

EUA - Estados Unidos da América

FDA - *Food and Drug Administration*

KTP - laser de Potássio-Titânio-Fosfato

LASER - *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

Nd: YAG - laser Neodímio YAG

SC - Solução de Carnoy

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

YAG - *Yttrium-Aluminum Garnet* (Granada Ítrio Alumínio)

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 2.1 Laser Diodo..... | 18 |
| 3 JUSTIFICATIVA..... | 21 |
| 4 HIPÓTESES | 22 |
| 5 OBJETIVO | 23 |
| 5.1 Objetivo geral..... | 23 |
| 5.2 Objetivos específicos..... | 23 |
| 6 MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| 6.1 Considerações éticas..... | 24 |
| 6.1 Desenho de estudo..... | 24 |
| 6.2 Amostra..... | 24 |
| 6.3 Procedimento cirúrgico | 25 |
| 6.4 Métodos de avaliação | 31 |
| 7 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 32 |
| 8 RESULTADOS | 33 |
| 9 DISCUSSÃO..... | 45 |
| 10 CONCLUSÃO | 48 |
| APÊNDICE A - Submissão de artigo no international journal of oral and maxillofacial surgery | 54 |

ANEXO A - Parecer da CEUA-UFMG70

1 INTRODUÇÃO

O tratamento de diversas entidades patológicas recidivantes da cavidade bucal tem como objetivo complementar a redução do risco de recorrência. Muitos são os métodos adjuvantes, disponíveis atualmente na literatura, que visam o auxílio ao tratamento de cistos e tumores odontogênicos. Estão bem descritos terapias como a crioterapia (SCHMIDT, 2003), drogas antimetabólicas (LEDDERHOF *et al.* 2016) e a Solução de Carnoy (VOORSMIT, 1984; HAQ *et al.*, 2016, LEE *et al.*, 2004). Sendo essa última, muito relacionada à adjuvância no tratamento de Ceratocistos Odontogênicos (COs). Dentre os métodos terapêuticos mais comuns para o tratamento do CO, pode-se destacar a marsupialização, a enucleação associada à alguma terapia adjuvante e ressecção (STOELINGA, 2005; ALMORAISSE *et al.*, 2016; LEUNG *et al.* 2016; GUPTA *et al.*, 2016). Independentemente do método, todas as terapias visam a diminuição das taxas de recidiva através da eliminação do componente cístico epitelial, sob a forma de microcistos e ilhas de epitélio, que podem dar origem a uma nova lesão (STOELINGA, 2005). O acompanhamento minucioso (clínico-imagiológico) é essencial para a detecção de recidivas em tempo breve, otimizando o prognóstico do tratamento (CUNHA *et al.*, 2016).

LASER é um acrônimo para Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation. O laser se diferencia de outras fontes de luz devido às suas características de coerência, monocromaticidade, alta potência e colimação. Existem vários tipos de lasers de diferentes potências e características disponíveis atualmente.

Dentre aqueles de interesse do nosso estudo, destacam-se os lasers cirúrgicos de CO₂, Neodímio-Ítrio-Alumínio-Garnet (Nd:YAG), potássio-titânio-fósforo (KTP) e os lasers diodo. Cada tipo de laser irá desencadear um efeito tecidual de acordo com as características da radiação e do tecido-alvo (CARROLL e HUMPHREYS, 2006; ROMEO *et al.*, 2007). Sabe-se que alguns lasers podem desencadear necrose tecidual, que pode ocorrer em diferentes profundidades de acordo com o tipo de laser e a potência do aparelho, assim como a interação da radiação com o tecido (CARROLL e HUMPHREYS, 2006).

Os lasers diodo utilizam elementos em estado sólido (ex.: gálio, arsênio, alumínio, índio) que visam a produção de energia luminosa a partir da energia elétrica dos átomos dos referidos elementos (KRAVITZ e KUSNOTO, 2008). A irradiação pelo laser diodo apresenta alta absorção e pequena profundidade de penetração. Devido à sua pouca absorção aquosa, a radiação do laser diodo é capaz de penetrar de 4 a 5mm em tecidos moles e pode gerar calor com capacidade de coagulação a uma profundidade de 7 a 10 mm (ANGIERO *et al.*, 2008). Tendo em vista o potencial de necrose do laser e de sua boa penetração nos tecidos, supõe-se que ele possa ser um adjuvante no tratamento de diversas lesões da cavidade bucal, considerando-se as seguintes capacidades: de corte que produz cicatrização tecidual satisfatória (AMARAL *et al.*, 2015; HAVEL *et al.*, 2014); de coagulação que possibilita o tratamento de malformações vasculares (GENOVESE *et al.*, 2010); de boa absorção pela melanina como um dos principais cromóforos do laser diodo, o que possibilita a remoção de lesões pigmentadas (DESIATE *et al.*, 2009); pelo potencial de corte, atividade bactericida e pequena dimensão da fibra do aparelho, facilita o tratamento de lesões e afecções dos tecidos periodontais (DESIATE *et al.*, 2009; EUZEBIO-ALVES *et al.*, 2013; ISOLA *et al.*, 2017).

Até o momento, não há trabalhos descritos na literatura que evidenciem a penetração do laser diodo de alta intensidade nos tecidos moles e duros da cavidade bucal. Desse modo, se faz necessário conduzir uma avaliação da profundidade de penetração do laser nos referidos tecidos, a fim de que se obtenham parâmetros para estabelecimento de protocolos aplicáveis clinicamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Laser Diodo

A utilização de laser para tratamentos cosméticos e de determinadas lesões tem sido reconhecida na literatura e tornou-se uma ferramenta importante dentre as opções de tratamento utilizadas por cirurgiões-dentistas. A ciência física dos lasers baseia-se na atividade de elétrons e em sua habilidade em absorver e armazenar energia (ROMEO *et al.*, 2007; DESIATE *et al.*, 2009; ROMEO *et al.*, 2010; GUPTA, 2011).

Guttenberg e Emery (2004) ressaltam a existência de cromóforos, que são compostos que absorvem a luz como: água, hemoglobina e melanina. Quando a pele ou a mucosa são expostas à radiação de laser de CO₂, o componente aquoso é aquecido até a ebulição e as proteínas se desnaturam. A profundidade do dano ao tecido é diretamente proporcional à dose de irradiação utilizada.

O uso dos lasers evoluiu consideravelmente nos últimos anos. Os estudos se iniciaram com o laser de CO₂, mas atualmente, existe uma grande variedade de equipamentos com comprimentos de onda únicos e que têm sido instituídos com sucesso para várias aplicações e tipos de tecidos (WLODAWSKY e STRAUSS, 2004).

De acordo com o comprimento de onda (λ) e a absorção da energia pelos cromóforos biológicos, os lasers são empregados para diferentes necessidades clínicas. Podem ser utilizados de duas formas distintas em relação às características de emissão: para incisões, o modo contínuo deve ser empregado, de maneira que a energia se concentre em pequenas áreas de 0,1 a 0,5 mm; e para ablação, quando a energia é aplicada de modo mais amplo, áreas de 1 a 5 mm são atingidas. A energia total depositada nos tecidos depende do tempo de aplicação e da potência do emissor, sendo que essas características determinam os diferenciais entre os tipos de laser (NEUKAM e STELZLE, 2010).

Os principais lasers disponíveis atualmente são os mencionados abaixo:

- Neodímio-Ítrio-Alumínio (Nd:YAG / λ : 1064 nm): é pobremente absorvido em água e seletivamente absorvido pela hemoglobina. É capaz de penetrar em até 10 mm nos tecidos (através da técnica de Fotocoagulação), sendo muito utilizado no tratamento de lesões vasculares. (VESNAVER e DOVSAK, 2009);

- Dióxido de carbono (CO₂ / λ : 10.600 nm): é um excelente laser, devido às propriedades de mínima dispersão, rápida vaporização do tecido, excelente absorção pela água e danos insignificantes aos tecidos. É um laser de precisão, muito utilizado para produzir incisões com boa hemostasia (ROMEIO *et al.*, 2007);

- Érbio-Ítrio-Alumínio (Er:YAG / λ : 2940 nm): possui boa absorção pela água, profundidade de penetração limitada, causando poucos danos aos tecidos adjacentes (NEUKAM e STELZLE, 2010);

- Íon argônio (λ : 488 nm): laser de pequeno comprimento de onda, utilizado para fotocoagulação de pequenos vasos (GREEN *et al.*, 2011);

- Potássio-Titânio-Fósforo (KTP / λ : 532 nm) utilizado para tratamento de leucoplasias, devido à sua boa penetração e espalhamento nos tecidos adjacentes, mostrando-se mais efetivo na prevenção de recidivas dessa lesão (GREEN *et al.*, 2011). Além disso, é amplamente indicado para o tratamento de mal-formações vasculares por apresentar especificidade pela hemoglobina (MIYAZAKI *et al.*, 2009);

- Laser diodo (λ : 805-980 nm): é bem absorvido pelo tecido gengival e pode ser utilizado para descontaminação de implantes e tecidos periimplantares (STRAUSS e FALLON, 2004; GREEN *et al.*, 2011), na realização de cirurgias periodontais e no tratamento de lesões como cistos periodontias laterais (ISOLA *et al.*, 2017) e hiperplasias gengivais (GREEN *et al.*, 2011; AMARAL *et al.*, 2015). Além disso, é amplamente utilizado no tratamento de anomalias vasculares (TORRES *et al.*, 2010; JASPER *et al.*, 2015).

O laser diodo é pobremente absorvido pela água e seletivamente absorvido pela hemoglobina (ANGIERO *et al.*, 2008). Devido à sua pouca absorção aquosa, é capaz de penetrar aproximadamente 4 ou 5 mm (HERNANDEZ-DIVERS, 2002; ANGIERO *et al.*, 2008). Uma vez infiltrado no tecido, o laser pode gerar calor

com capacidade de coagulação a uma profundidade de 7 a 10mm, processo denominado de Fotocoagulação. Sua energia é liberada através de uma fibra óptica, com uma energia de 2,5 a 6W, em modo contínuo por 5 a 10 segundos de exposição, por meio da técnica de Desidratação Forçada com Fotocoagulação Induzida (DFFI), sem contato com o tecido-alvo (mantida a uma distância de 2 a 3mm) (ANGIERO *et al.*, 2008).

As principais complicações relacionadas à terapia com laser diodo estão relacionadas à transferência de energia aos tecidos vizinhos. É preciso ter cautela com membranas mucosas, pele e estruturas nobres (ex.: nervos) nas proximidades da região-alvo do tratamento (ÁLVAREZ-CAMINO *et al.*, 2013), uma vez que pode ocorrer dano à mucosa de recobrimento, necrose tecidual, dano neural e estenose de glândulas (ANGIERO *et al.*, 2008).

Fisher *et al.* (2001) atentaram para os cuidados com a utilização dos lasers e ressaltaram o risco de necrose ou carbonização dos tecidos se a radiação for aplicada diretamente sobre os tecidos, sem o auxílio da fibra óptica. Os autores sugerem que podem haver efeitos sistêmicos adversos relacionados diretamente à fotocoagulação intralesional (hipercalemia, hemoglobinemia, leucocitose, dentre outros), que podem dificultar a recuperação dos indivíduos nos casos de lesões de grandes dimensões e tratamentos mais complexos. Nesses casos, o manejo pós-operatório pode exigir antibioticoterapia e a avaliação de hemograma e ionograma.

A irradiação do laser diodo apresenta alta absorção e pequena profundidade de penetração. Sugere-se que o comprimento de onda do laser possa ser transmitido ao osso medular após sua interação na superfície óssea (GOHARKHAY *et al.*, 1999).

Tendo em vista o potencial de necrose e penetração nos tecidos (GOHARKHAY *et al.*, 1999; HERNANDEZ-DIVERS, 2002; JAYASREE *et al.*, 2009), apesar de não haver na literatura citações sobre a laserterapia aplicada no tratamento de lesões recidivantes, supõe-se que o laser poderia ser um adjuvante no tratamento de tumores odontogênicos, diminuindo o potencial de recidiva, uma vez que causaria a necrose dos remanescentes patológicos que poderiam influenciar uma recorrência.

3 JUSTIFICATIVA

O laser, pelo seu potencial de penetração mais profunda e estimulação de necrose tecidual, pode ser considerado uma terapia válida no tratamento de diversas lesões da cavidade bucal. Entretanto, o potencial de penetração desse tipo de radiação, bem como os efeitos causados por ela, ainda não foram amplamente estudados. Este trabalho visa a obtenção de parâmetros quanto à profundidade de penetração do laser diodo e os efeitos teciduais decorrente de sua aplicação.

4 HIPÓTESES

- O laser, através do aumento da temperatura, gera desidratação e/ou desnaturação de proteínas que levam à necrose tecidual;
- O laser apresenta profundidade de penetração suficiente para atingir camadas internas do tecido ósseo.

5 OBJETIVO

5.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações teciduais e mensurar a penetração do laser diodo em tecidos mole e ósseo de coelhos Nova Zelândia.

5.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a profundidade de penetração do laser diodo em tecidos moles;
- b) Avaliar a penetração tecidual do laser diodo em tecidos ósseos;
- c) Mensurar a penetração tecidual do laser diodo em tecidos ósseos;
- d) Avaliar e caracterizar as alterações teciduais (mole e ósseo) causados pelo laser diodo.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Considerações éticas

Esta pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), segue os preceitos definidos pela Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). E foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 07/08/2017, sob o número de protocolo 63/2017 (ANEXO A).

6.1 Desenho de estudo

O estudo caracteriza-se como um ensaio clínico experimental em animais *ex vivo*.

6.2 Amostra

A partir do estudo piloto obteve-se o cálculo amostral.

Foram obtidos 09 coelhos da espécie Nova Zelândia, do setor de Cunicultura da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da UFMG, em Igarapé/MG. Os animais selecionados apresentavam similaridade de idade e peso. A escolha do espécime animal baseou-se nas dimensões corporais que possibilitavam a manipulação e aplicação das técnicas e quanto à viabilidade de acesso aos animais da amostra.

6.3 Procedimento cirúrgico

Os animais foram eutanasiados por meio da técnica de sobredosagem de barbitúrico (Pentobarbital Sódico - Nembutal), conforme recomendações dos órgãos competentes (ANDRADE et al., 2002; AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION [AVMA], 2013; BRASÍLIA, 2013; BRASIL, 2016). Para esse fim, foram utilizados métodos de contenção manual dos animais, equipamentos de proteção individual (EPIs) e insumos para atendimento clínico, incluindo agulha para injeções de calibre menor que 20G. Inicialmente foi administrado anestésico local pela via intramuscular (Quetamina 30 mg/kg associada a Xilazina 5 mg/kg) e posteriormente aplicado Pentobarbital na dosagem de 90 mg/kg, em volume máximo de 100 mL, pela via intraperitoneal (quadrante abdominal inferior direito), seguida de exsanguinação por punção cardíaca. Todos os animais possuíam idade média de 90 dias e os procedimentos foram realizados na Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da UFMG, em Igarapé/MG, segundo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013). Este método permitiu que a carcaça não fosse afetada comprometendo as estruturas anatômicas desejadas para o experimento. Cada animal foi abatido apenas previamente à dissecação e à terapia instituída, de acordo com o grupo a ser direcionado.

Foram utilizados 09 animais, que deram origem a 36 amostras. Os animais foram divididos em três grupos, como se segue: Grupo 0 (G0): controle negativo; Grupo laser 1 (G1); Grupo laser 2 (G2).

Após a eutanásia, as carcaças foram dissecadas, de modo a se obter as estruturas da mucosa jugal (bilateralmente) e tecido ósseo mandibular (FIGURAS 1 e 2).

A excisão das mucosas jugais foi realizada com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15 fixada à um cabo de bisturi nº 4. Após a excisão do tecido, uma incisão circular foi promovida com auxílio do bisturi do tipo *punch* (de 8 mm de diâmetro), visando a obtenção de uma área de dimensões similares entre todas as amostras (FIGURA 3).



Figura 1: disseção da mucosa jugal.

Fonte: do autor



Figura 2: disseção da mandíbula.

Fonte: do autor



Fonte: do autor

Figura 3: delimitação das mucosas jugais para demarcação (com *punch*) da área a ser irradiada.

Após a dissecação das peças de tecidos ósseos, o osso mandibular foi seccionado em duas partes (direita e esquerda) e, em seguida, foi realizada uma perfuração, com utilização de broca cilíndrica de 2,8 mm (Neodent®, Curitiba, Brasil) visando a obtenção de leitos ósseos de dimensões similares entre as amostras (FIGURA 4).



Fonte: do autor

Figura 4: perfuração do osso mandibular, com broca cilíndrica 2.8 mm, para demarcação da área a ser irradiada.

Após a definição da área de tecido mole (jugal) e tecido ósseo (mandíbula) (FIGURA 5), as terapias de cada grupo foram aplicadas da seguinte maneira: **grupo controle (G0)**: foram realizadas apenas a demarcação das áreas de tecido mole e duro; **grupo laser (G1)**: após a demarcação das áreas em tecido mole e duro, o laser foi ajustado (potência de 4.5W, modo contínuo) e aplicado, no modo de contato da fibra óptica com o tecido-alvo, em toda a área definida, até que se obtivesse o parâmetro clínico de alteração tecidual (branqueamento do tecido mole e escurecimento do tecido ósseo), decorrente de sua queima (MIYAZAKI *et al.*, 2009); **grupo laser (G2)**: utilizou-se a mesma metodologia aplicada no G1, entretanto, o laser foi aplicado nos tecidos mole e duro pelo dobro do tempo que fora empregado para a amostra prévia (G1) (FIGURA 6A, 6B). Os valores de densidade de energia (dosimetria) empregados para cada amostra foram tabelados. (Tabelas 2 e 3)



Figura 5: tecidos ósseo e mole prontos para receber a radiação laser.

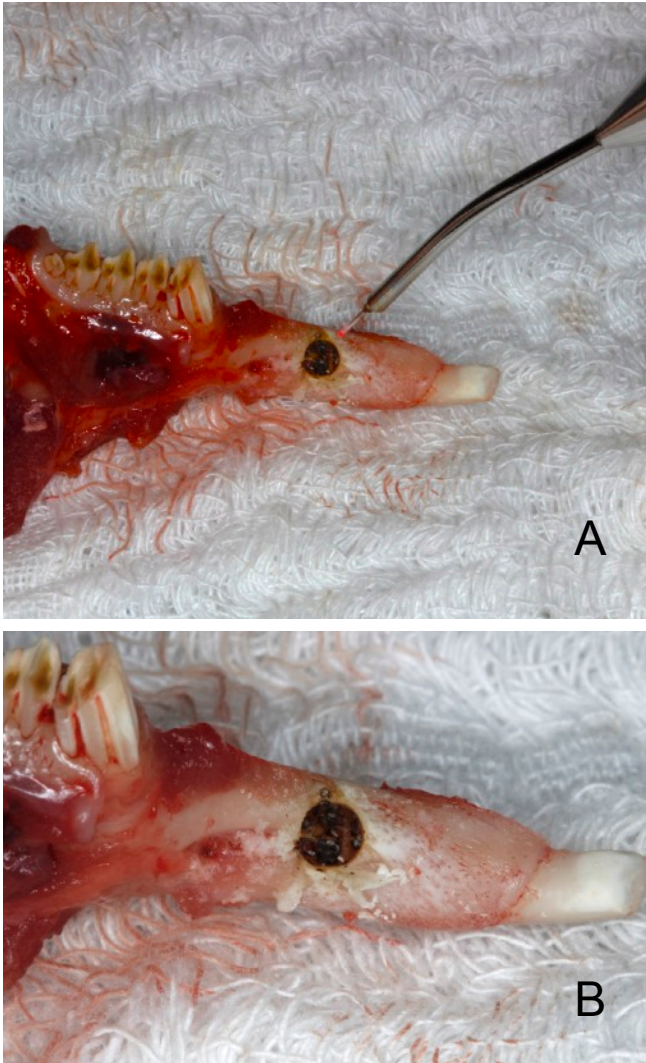


Figura 6: a) aplicação do laser até atingir o parâmetro clínico de escurecimento do osso; b) vista aproximada.

Para aplicação do laser, foi utilizado o aparelho de laser diodo, de comprimento de onda de 808 nm (Thera Lase Surgery®; DMC Ltda, São Carlos, Brazil), contendo uma fibra óptica de 400µm, ajustado na potência de 4.5W, em modo contínuo.

Após a aplicação da radiação, realizaram-se duas osteotomias (mesial e distal ao defeito ósseo criado) com auxílio de disco diamantado sob irrigação abundante com soro fisiológico estéril (SF 0,9%), com distância de segurança maior que 5 mm do segmento onde o laser foi aplicado, de modo a se obter segmentos ósseos de morfologia similar (FIGURA 7). Ressalta-se que, tendo em vista a pequena amostra do estudo, cada terapia foi instituída em apenas um animal por vez. Desse modo, visando diminuir ao máximo o tempo entre a eutanásia e o tratamento, esse último foi aplicado imediatamente após dissecação dos tecidos.



Fonte: do autor

Figura 7: delimitação distal para secção do osso mandibular.

Após a aplicação do laser os espécimes ósseos foram irrigados abundantemente com 5mL de SF 0,9%, de modo que os resíduos decorrentes da carbonização dos tecidos pudessem ser removidos. Em seguida, as peças foram preparadas e imersas em solução de formol 10%, visando a fixação dos tecidos, por tempo mínimo de 24 horas. Para a descalcificação das peças ósseas, os segmentos mandibulares foram imersos em ácido nítrico (5%) por aproximadamente 24 horas. Em seguida, procedeu-se ao preparo para análise histológica, após coloração em hematoxilina-eosina de todas as peças de tecidos moles e duros descalcificados.

O descarte das carcaças não utilizadas foi realizado de acordo com o Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde (Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2006). Dessa forma, foram embaladas em papel absorvente, enroladas em plástico branco leitoso identificado com símbolo de resíduo infectante, preso com fita resistente à umidade, colocadas em bombonas plásticas e conservadas em *freezer* até a data do descarte. Esse último é realizado pela Via Solo Engenharia Ambiental S.A., empresa licenciada e contratada pela UFMG, segundo recomendações da Gerência de resíduos e higienização da Escola de Veterinária da UFMG.

6.4 Métodos de avaliação

Os efeitos do laser diodo sobre os tecidos foram avaliados macroscópica e microscopicamente utilizando microscópio óptico de luz.

Foram considerados os seguintes parâmetros:

- Avaliação das alterações teciduais ocasionadas pelo contato com o laser diodo;
- Estratificação do dano tecidual ocasionadas pelo contato com o laser diodo nas diferentes camadas dos tecidos epitelial e conjuntivo;
- Profundidade de penetração do laser diodo (em micrômetros), avaliada por meio de análise histomorfométrica, da seguinte maneira:
 - Análise dos cortes histológicos utilizando microscopia óptica de luz Opticam O600R (Opticam Microscopy Technology, São José dos Campos, Brasil);
 - Registro fotográfico dos cortes histológicos com auxílio da câmera acoplada ao microscópio Opticam O600R (Opticam Microscopy Technology, São José dos Campos, Brasil);
 - Mensuração da extensão da alteração histológica com auxílio do software Opticam Microscopia OPTHD (versão x64, 3.7.8648) (Opticam Microscopy Technology, São José dos Campos, Brasil).

7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos com a análise das amostras foram compilados e submetidos a avaliação estatística com auxílio do programa SPSS para Windows, versão 20.0 (SPSS Inc., Armonk, NY, USA).

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para avaliar a normalidade das amostras. Essa análise demonstrou que os dados quantitativos apresentaram distribuição não-normal. Desse modo, foi aplicado o teste Mann-Whitney para avaliação da diferença entre os grupos G1 e G2. A significância estatística foi definida em relação aos valores de $p < 0,05$.

8 RESULTADOS

Após a exclusão de amostras com material insuficiente para análise, foram obtidas 36 amostras de tecidos, que foram divididos da seguinte forma:

- **G0:** 02 amostras do grupo controle para tecido mole e 02 amostras para tecido ósseo;
- **G1:** 08 amostras de tecido mole irradiado pelo laser e 08 amostras de tecido ósseo irradiado pelo laser;
- **G2:** 08 amostras de tecido mole irradiado pelo laser e 08 amostras de tecido ósseo irradiado pelo laser.

Considerando-se a fórmula da área do círculo ($A = \pi.r^2$), onde o *punch* utilizado possuía 8 mm de diâmetro (0,8 cm), a área de tecido mole irradiada foi de aproximadamente 0,50 cm² (conforme cálculo abaixo):

$$A = \pi.r^2$$

$$A = 3,14 \times 0,16$$

$$A = 3,14 \times (0,4\text{cm})^2$$

$$\mathbf{A = 0,50\text{cm}^2}$$

Considerando-se a fórmula da área do cilindro ($A_t = 2.A_b + A_l$), onde a

| | Nº de amostras | G1 | G2 |
|--------|----------------|----|----|
| Grau 0 | 2 | - | - |
| Grau 1 | 2 | 2 | - |
| Grau 2 | 3 | 3 | - |
| Grau 3 | 2 | - | 2 |
| Grau 4 | 4 | 1 | 3 |
| Grau 5 | 5 | 2 | 3 |

broca utilizada possuía 2,8 mm (0,28 cm) de diâmetro e a profundidade de perfuração média foi de 1,5 mm (0,15 cm), a área de tecido ósseo irradiado foi de aproximadamente 0,25cm² (conforme cálculo abaixo):

$$A_t = 2.A_b + A_l$$

$$A_t = 2.(0,06) + 0,13$$

$$A_t = 2.(\pi.r^2) + (2.\pi.r.h)$$

$$A_t = 0,12 + 0,13$$

$$A_t = 2.(3,14 \times 0,14^2) + (2 \times 3,14 \times 0,14 \times 0,15)$$

$$\mathbf{A_t = 0,25\text{cm}^2}$$

Ainda que ambos os cálculos se baseiem em formas geométricas regulares, a partir desses números pode-se estimar a energia depositada nos tecidos. O aparelho de laser utilizado fornece, imediatamente, os valores de dosimetria empregada nos tecidos. Esses valores baseiam-se nos cálculos obtidos a partir da fórmula: ***Potência = tempo / área***

Ao final das análises histológicas, considerando-se apenas os tecidos moles, 18 amostras foram incluídas na avaliação final. As amostras foram agrupadas de acordo com o dano tecidual observado microscopicamente, levando-se em consideração a seguinte gradação: Grau 0: controle negativo (FIGURA 8); Grau 1: dano tecidual observado em até 1/3 da espessura total do epitélio (FIGURA 9); Grau 2: dano tecidual observado em até 2/3 da espessura total do epitélio (FIGURA 10); Grau 3: dano tecidual observado em toda a espessura do epitélio, sem atingir o tecido conjuntivo (FIGURA 11); Grau 4: dano tecidual observado em toda a espessura do epitélio, atingindo a interface epitélio-conjuntivo (FIGURA 12); Grau 5: dano tecidual observado em toda a espessura do epitélio, atingindo conjuntivo até a camada muscular (FIGURA 13). Os resultados revelam que 50% da amostra total produziu dano tecidual condizente com os estratos mais profundos (graus 4 e 5), tendo sido mais proeminente dentre as amostras do G2. A avaliação da gradação histológica dos tecidos moles, considerando-se a distribuição dos grupos G1 e G2 em relação ao dano tecidual, encontra-se expressa na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição das amostras de tecidos moles, considerando o grau de dano tecidual causado pelo laser.

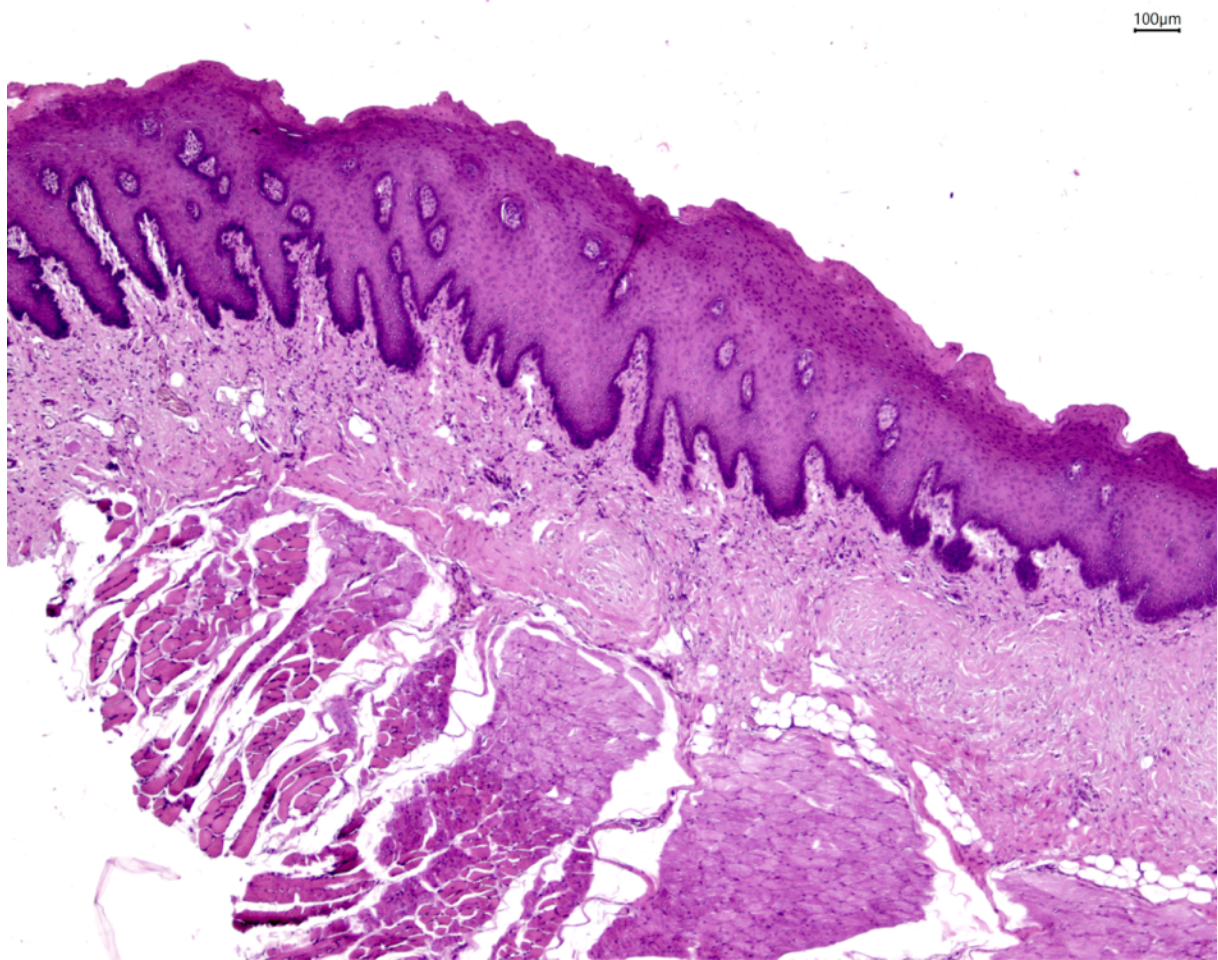


Figura 8: corte histológico (aumento 40x) do tecido mole, corado em Hematoxilina e Eosina (HE), representando o controle negativo.

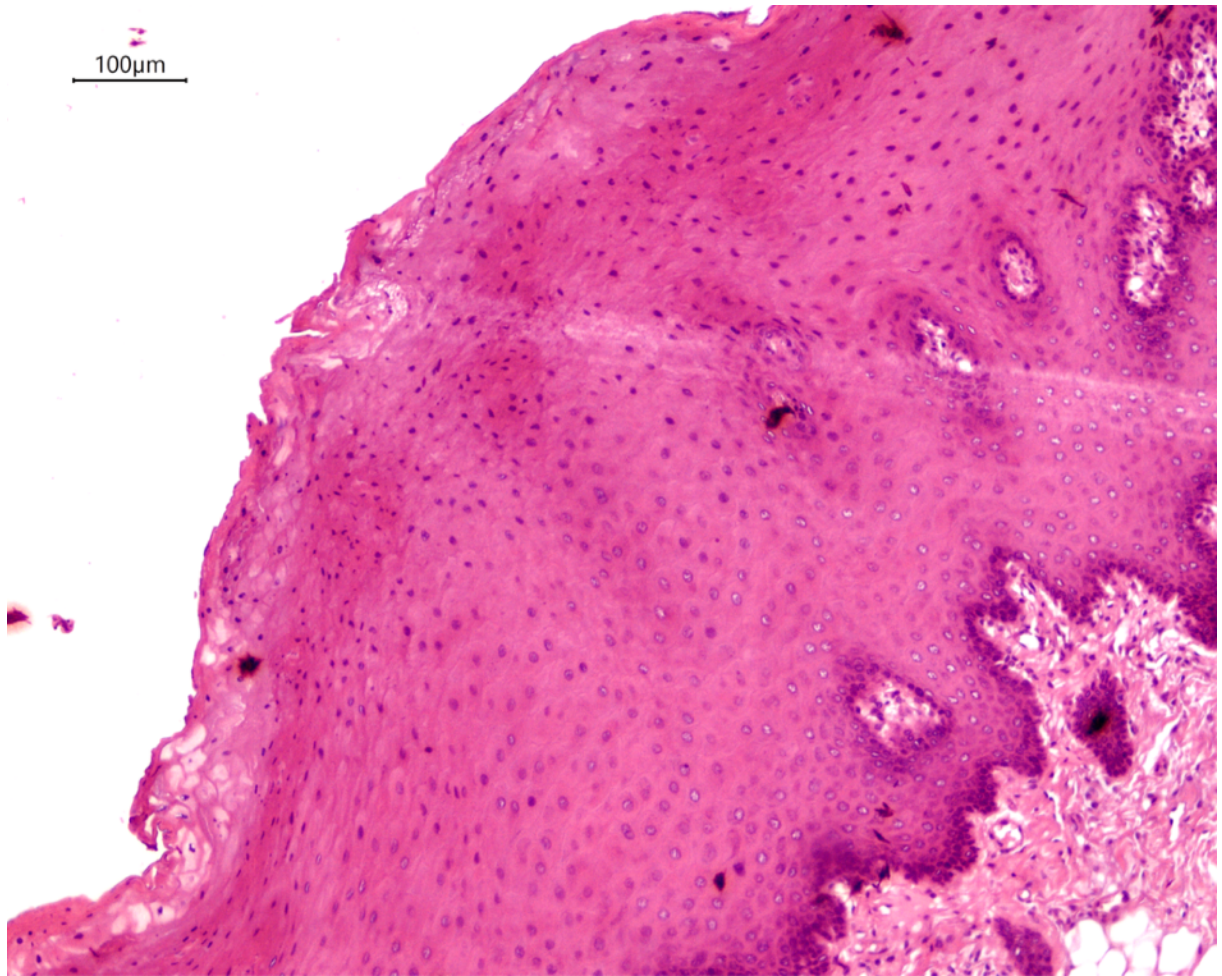


Figura 9: corte histológico (aumento 100x) do tecido mole, corado em HE, representando o dano tecidual grau 1.

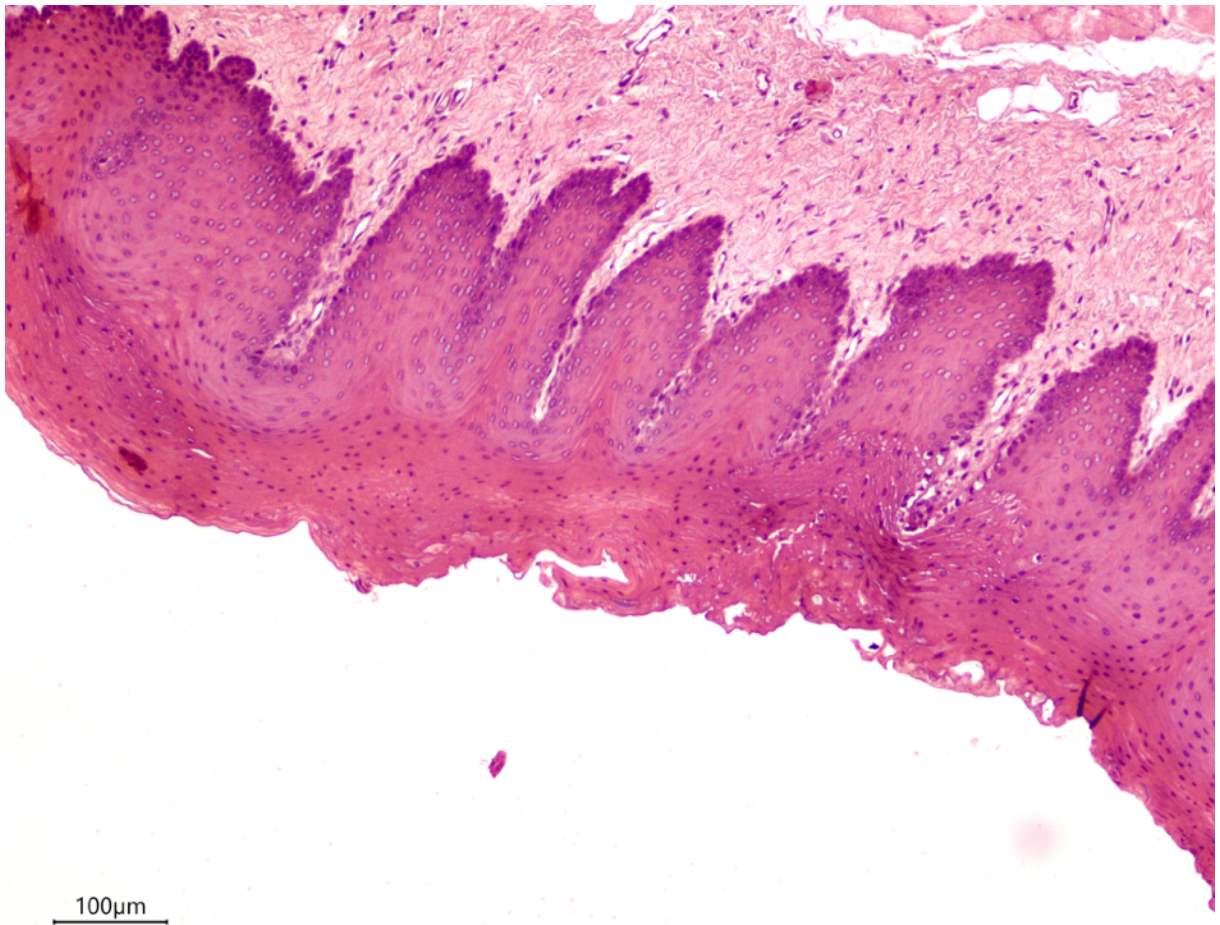


Figura 10: corte histológico (aumento 100x) do tecido mole, corado em HE, representando o dano tecidual grau 2.

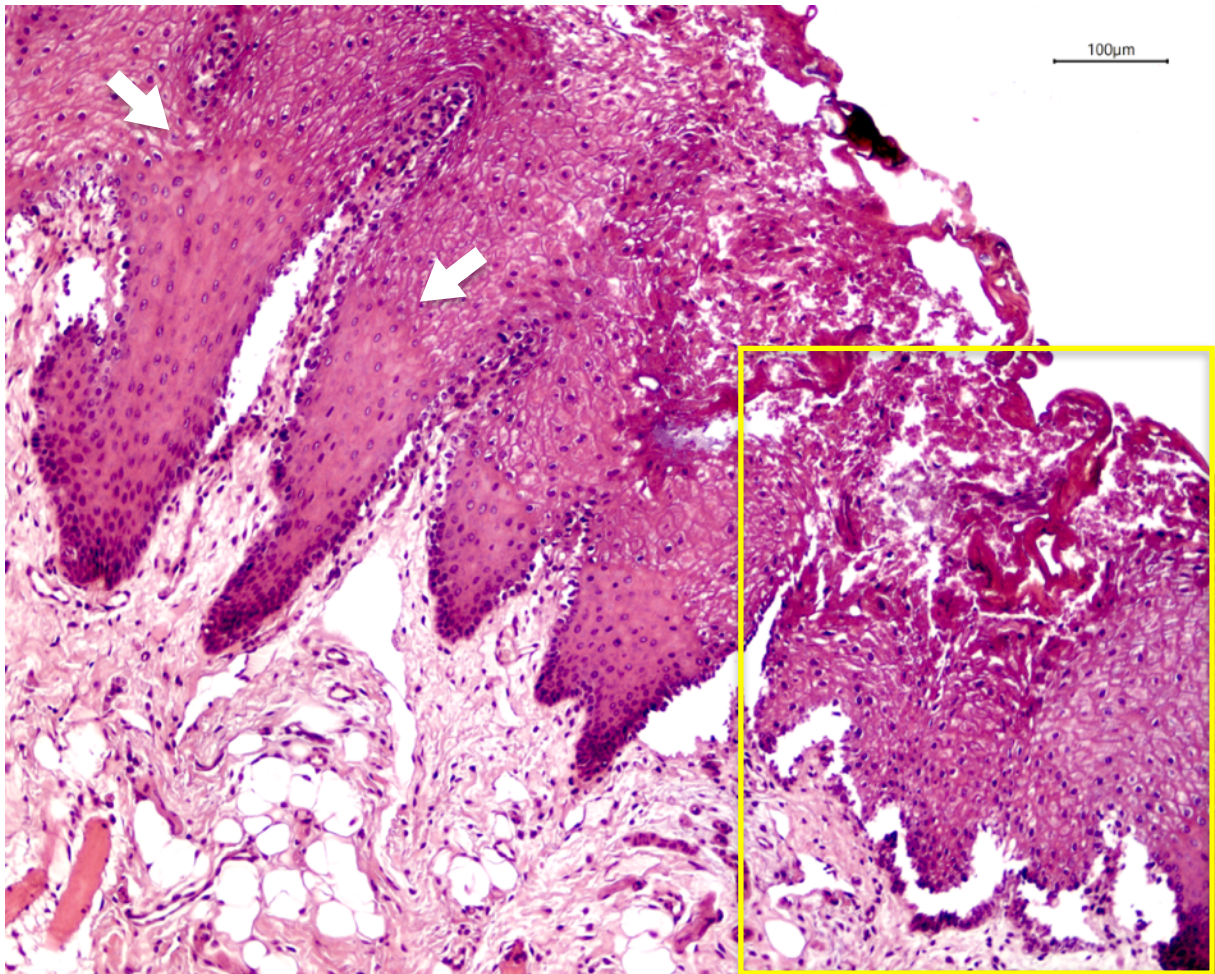


Figura 11: corte histológico (aumento 100x) do tecido mole, corado em HE, representando o dano tecidual grau 3 (quadro amarelo) e grau 2 (setas brancas).

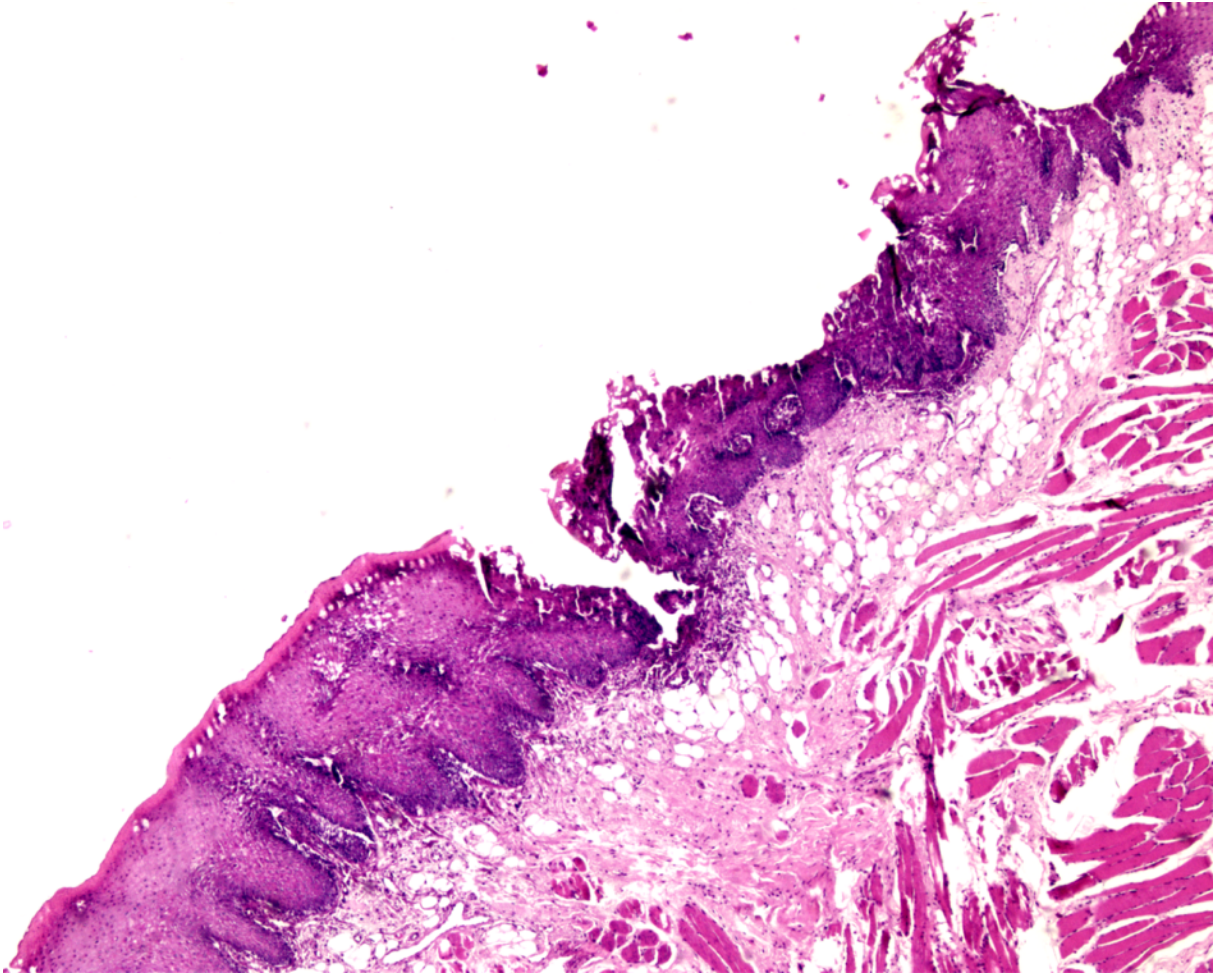


Figura 12: corte histológico (aumento 40x) do tecido mole, corado em HE, representando o dano tecidual grau 4.

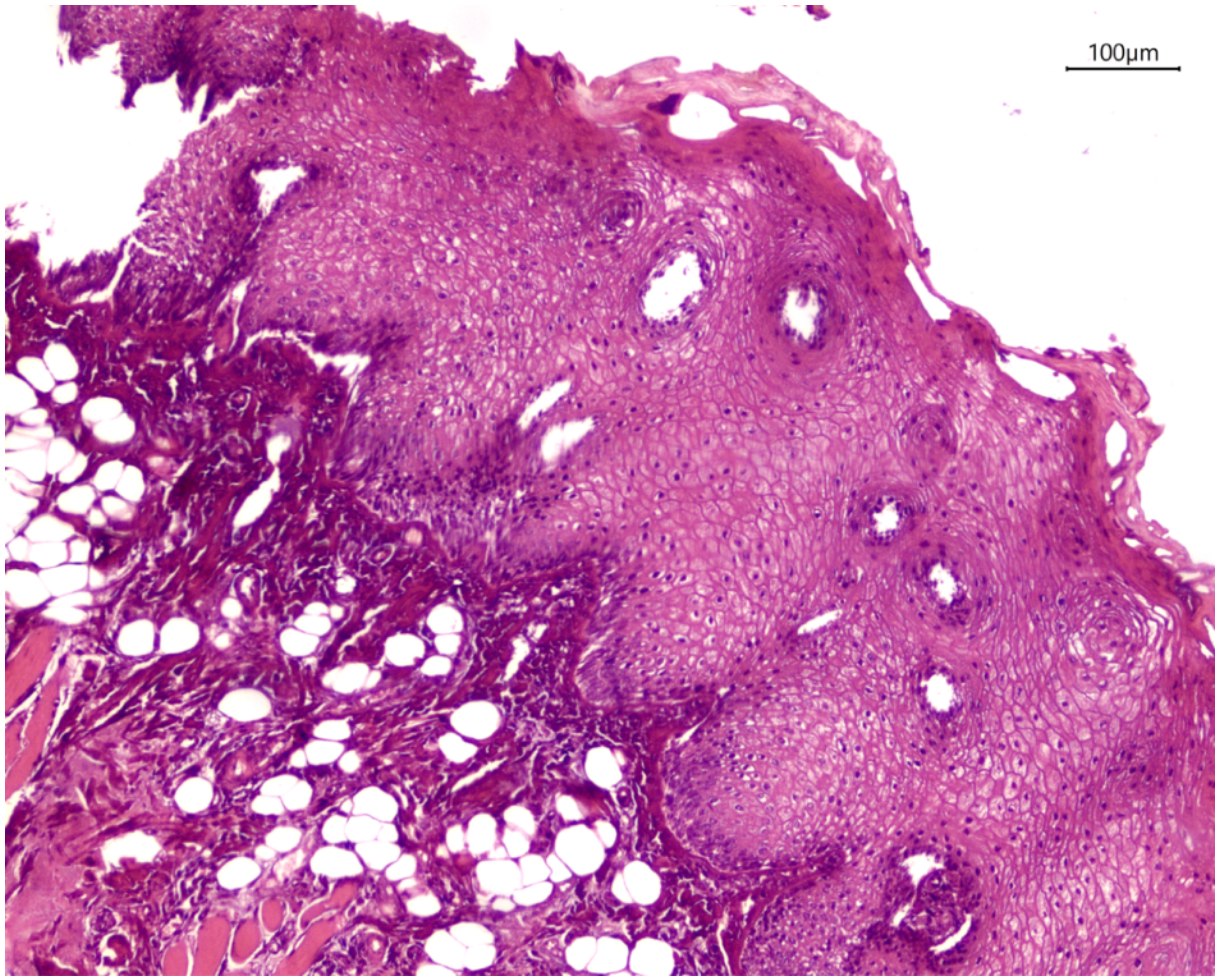


Figura 13: corte histológico (aumento 100x) do tecido mole, corado em HE, representando o dano tecidual grau 5.

Ao final das análises histológicas, considerando-se apenas os tecidos ósseos, cinco amostras de cada grupo foram excluídas e não foram inseridas na avaliação final, tendo em vista a impossibilidade de avaliação e mensuração dos cortes histológicos decorrente da perda de estrutura tecidual. Assim, o n final foi de três amostras por grupo (FIGURAS 14A, 14B). Os valores de densidade de energia (dosimetria) empregados para cada amostra foram reunidos e encontram-se dispostos nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Dados das energias aplicadas sobre os tecidos moles, no momento da aplicação do laser. Dosimetria média: 96,37J. (1): amostra pertencente ao G1. (2): amostra pertencente ao G2.

| | Potência | Tempo | Dosimetria |
|------------|----------|-------|------------|
| 2-7-3 (1) | 4.5W | 13s | 58J |
| 18-7-3 (1) | 4.5W | 09s | 40J |
| 22-7-3 (1) | 4.5W | 09s | 40J |
| 26-7-3 (1) | 4.5W | 11s | 49J |
| 30-7-3 (1) | 4.5W | 23s | 103J |
| 34-7-3 (1) | 4.5W | 14s | 63J |
| 38-7-3 (1) | 4.5W | 10s | 45J |
| 1-14-3 (1) | 4.5W | 22s | 99J |
| 8-7-3 (2) | 4.5W | 44s | 198J |
| 19-7-3 (2) | 4.5W | 18s | 81J |
| 31-7-3 (2) | 4.5W | 46s | 207J |
| 35-7-3 (2) | 4.5W | 28s | 128J |
| 39-7-3 (2) | 4.5W | 20s | 90J |
| 2-14-3 (2) | 4.5W | 26s | 117J |
| 3-14-3 (2) | 4.5W | 23s | 103J |
| 4-14-3 (2) | 4.5W | 27s | 121J |

Tabela 3: Dados das energias aplicadas sobre os tecidos ósseos, no momento da aplicação do laser. Dosimetria média: 74,18J. (1): amostra pertencente ao G1. (2): amostra pertencente ao G2. Amostras de tecido ósseo incluídas na análise final encontram-se assinaladas com *.

| | Potência | Tempo | Dosimetria |
|-------------|----------|-------|------------|
| *4-7-3 (1) | 4.5W | 16s | 72J |
| *12-7-3 (1) | 4.5W | 12s | 54J |
| 20-7-3 (1) | 4.5W | 10s | 45J |
| 24-7-3 (1) | 4.5W | 07s | 31J |
| 28-7-3 (1) | 4.5W | 10s | 45J |
| *32-7-3 (1) | 4.5W | 16s | 72J |
| 36-7-3 (1) | 4.5W | 07s | 31J |
| 40-7-3 (1) | 4.5W | 10s | 45J |
| *6-7-3 (2) | 4.5W | 32s | 144J |
| 16-7-3 (2) | 4.5W | 24s | 108J |
| *21-7-3 (2) | 4.5W | 20s | 90J |
| 25-7-3 (2) | 4.5W | 14s | 63J |
| 29-7-3 (2) | 4.5W | 20s | 90J |
| 33-7-3 (2) | 4.5W | 32s | 144J |
| 37-7-3 (2) | 4.5W | 14s | 63J |
| *41-7-3 (2) | 4.5W | 20s | 90J |

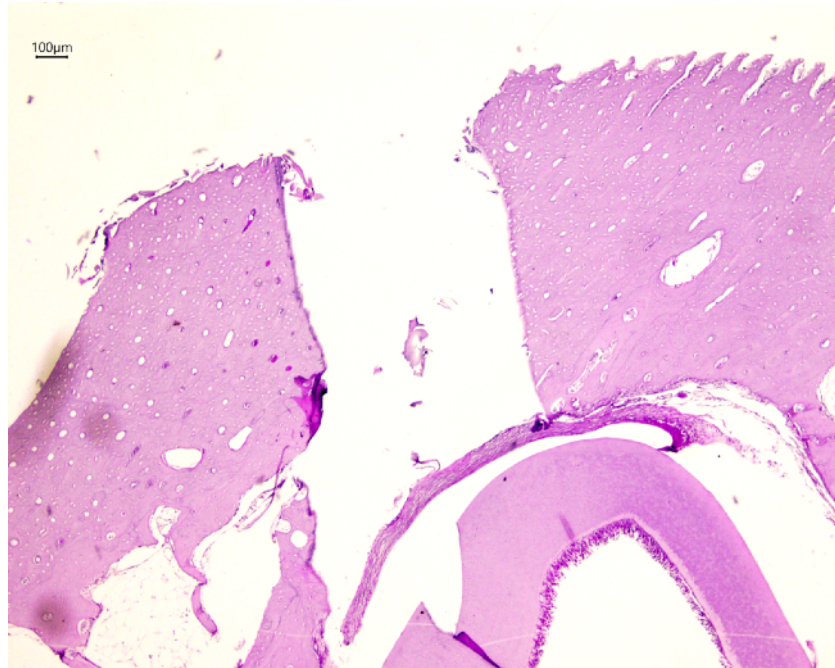


Figura 14a: corte histológico (aumento 40x) do tecido ósseo, corado em HE, representando a perfuração realizada com broca 2.8 mm.

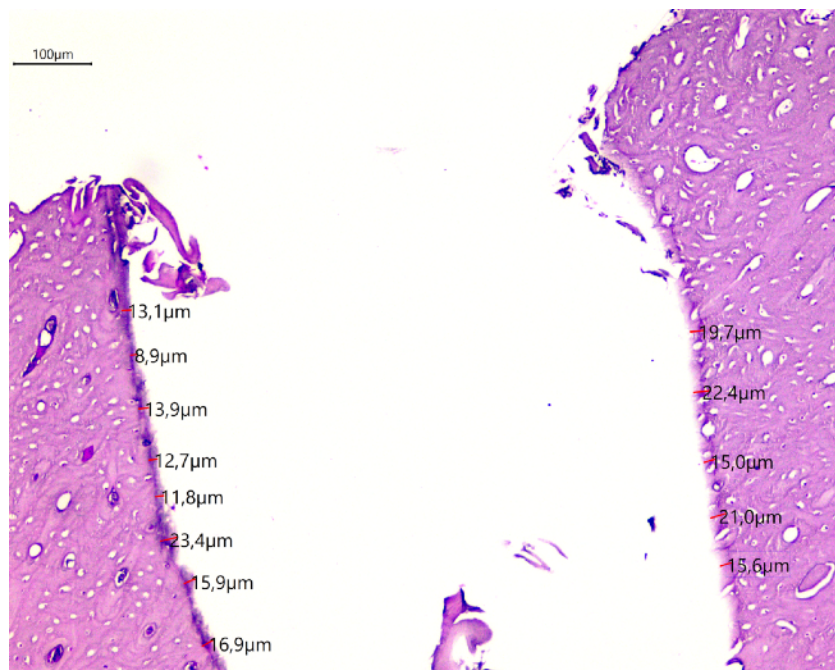


Figura 14b: corte histológico (aumento 100x) do tecido ósseo, corado em HE, evidenciando as medidas às margens do tecido ósseo, indicando dano tecidual pelo laser. Amostra pertencente ao grupo G1.

As amostras incluídas na análise histológica final dos tecidos ósseos apresentaram possibilidade de obtenção de 53 medidas (25 medidas do G1 e 28 do G2) que estão expressas (em micrômetros) na tabela 4.

Tabela 4: Medida de profundidade de penetração do laser diodo. Medidas obtidas através da avaliação microscópica do dano tecidual causado pela ação do laser diodo sobre os tecidos ósseos de coelhos Nova Zelândia.

| | 4-7-3 (G1) | 12-7-3 (G1) | 32-7-3 (G1) | 6-7-3 (G2) | 21-7-3 (G2) | 41-7-3 (G2) |
|---------------------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| Medidas (μm) | 9,5 | 25,7 | 13,0 | 3,5 | 13,1 | 3,6 |
| | 5,4 | 27,6 | 17,0 | 4,0 | 8,9 | 3,0 |
| | 15,3 | 25,4 | 2,6 | 2,6 | 13,9 | 4,9 |
| | 15,3 | 25,2 | | 1,8 | 12,7 | |
| | 3,5 | 14,4 | | 2,6 | 11,8 | |
| | 6,3 | 17,6 | | 5,6 | 23,4 | |
| | 5,4 | 8,6 | | 4,6 | 15,9 | |
| | 4,8 | 13,1 | | 3,9 | 16,9 | |
| | 12,0 | 8,3 | | 4,6 | 19,7 | |
| | 6,5 | 24,1 | | 12,7 | 22,4 | |
| | 9,5 | | | 12,4 | 15,0 | |
| | 15,2 | | | 8,8 | 21,0 | |
| | | | | | 15,6 | |

O grupo G1 apresentou média de penetração 13,25 μm (Desvio Padrão \pm 7,606) variando de 2,6 μm a 27,6 μm , enquanto o grupo G2 apresentou média de 10,32 μm (Desvio Padrão \pm 6,725) variando de 1,8 μm a 23,4 μm . A diferença entre as médias dos grupos foi considerada não significativa, apresentando valor de $p = 0,123$.

9 DISCUSSÃO

A proposta deste estudo baseia-se em diversos trabalhos que avaliam a penetração das radiações monocromáticas colimadas em diversos tipos de tecidos animais (GOHARKHAY *et al.*, 1999; HERNANDEZ-DIVERS, 2002 *et al.*; CARROLL e HUMPHREYS, 2006) e na avaliação dos efeitos que os lasers podem exercer sobre os tecidos orgânicos (ROMANOS e NENTWIG, 1999; ROMEO *et al.*, 2007; DESIATE *et al.*, 2009; CARROLL e HUMPHREYS, 2006; MIYAZAKI *et al.*, 2009).

Os lasers que apresentam comprimento de onda maior, dentro da faixa entre 700 nm e 10.000 nm (onde os lasers diodo se encontram), possuem potencial de aquecimento tecidual. Esse aquecimento pode levar à desnaturação proteica, explosões de células ricas em água, decomposição tecidual e carbonização (STRAUSS e FALLON, 2004). Esses aspectos puderam ser observados clinicamente, durante as aplicações do laser diodo sobre os tecidos, no momento em que se visualizaram as alterações de cor dos tecidos, decorrente do processo de carbonização do mesmo. Histologicamente, pôde-se também observar que o aumento da energia depositada influenciou diretamente o dano tecidual nos tecidos de fragmento de mucosa jugal (conforme dados da tabela 1). Por outro lado, o processo de carbonização dos tecidos pode ter influenciado a perda de amostras, sobretudo de tecidos ósseos mandibulares. Uma vez que parte do tecido afetado pela radiação do laser possa ter sido perdida, a análise torna-se menos viável e fidedigna. Por esse motivo, grande parte das amostras de tecido ósseo não pôde ser incluída na amostra final avaliada estatisticamente, tendo servido para propósitos de aprofundamento metodológico.

É sabido que, em geral, o comprimento de onda é diretamente proporcional à profundidade de penetração da luz laser e a interação do laser com o tecido também dependerá do seu cromóforo específico (GUTTENBERG e EMERY, 2004; CARROLL e HUMPHREYS, 2006). É sugerido, ainda, que o comprimento de onda do laser pode ser transmitido ao osso medular após sua interação na superfície óssea (GOHARKHAY *et al.*, 1999). O comprimento de onda dos lasers diodo (810-980 nm) aproxima-se do comprimento de onda da melanina, por esse motivo sua energia luminosa é bem absorvida em tecidos moles e pobremente

absorvida em tecidos duros, como o osso e dentes, que não possuem melanina (KRAVITZ e KUSNOTO, 2008). Esse fato pode ter influenciado a absorção mais intensa nos tecidos moles. Porém, também é possível que tenha colaborado para a dificuldade de detectar o dano nos tecidos duros, ou a faixa de tecido necessária para a análise da profundidade de penetração tenha sido perdida pelo processo de carbonização.

Os lasers interagem com os tecidos de quatro maneiras: transmissão, reflexão, dispersão e absorção, sendo esse último o fundamento clínico de ação dos lasers. Apenas através da absorção, poderá ser produzido algum efeito tecidual (CARROLL e HUMPHREYS, 2006). Devido à sua pouca absorção aquosa, o laser diodo é capaz de penetrar até 4 ou 5 mm em tecidos moles (HERNANDEZ-DIVERS, 2002; ANGIERO *et al.*, 2008). Nesse aspecto, pudemos observar que o laser foi densamente absorvido nos tecidos moles (ainda que não tenha sido possível mensurar) e em menor grau nos tecidos duros (ainda que não tenha sido observada penetração significativa). Entretanto, para que seja possível avaliar a dispersão da luz no tecido se faz necessária a avaliação por meio de câmera CCD (Couple-Charged Device) (HUDSON *et al.*, 2013).

Os efeitos do laser dependem de diversos fatores como o comprimento de onda específico da energia luminosa, o diâmetro da fibra utilizada no aparelho, as características do tecido que receberá a radiação, o modo de aplicação (contato ou não-contato) e a potência do aparelho (HAVEL *et al.*, 2014). Um estudo que avaliou o dano tecidual, revelou que uma fibra óptica de 400 μm , sob uma potência de 4.5W, em modo pulsado, pode promover uma incisão de 737,5 μm de profundidade. Os autores concluem que a profundidade e largura de incisão estariam, em maior parte, relacionados à potência do aparelho (GOHARKAY *et al.*, 1999). O laser diodo pode ser aplicado em modo contato (da fibra óptica com o tecido) e não-contato, sendo que a profundidade de penetração torna-se aproximadamente 90% menor no modo de contato (HERNANDEZ-DIVERS, 2002). O fato de termos eleito o modo contato se deu com objetivo de avaliar a penetração mínima que o laser poderia obter, vislumbrando a similaridade com o osso mandibular humano em que o canal mandibular não poderia ser atingido.

O laser diodo vem sendo utilizado, há algum tempo, para o tratamento de lesões da cavidade bucal como hiperplasia fibrosa inflamatória (AMARAL *et al.*, 2015), mal-formações vasculares (MIYAZAKI *et al.*, 2009), mucocelos (AHAD *et al.*, 2017), cistos de erupção (BOJ *et al.*, 2006) e tumores (NEUKAM e STELZLE, 2010), podendo também ser utilizado para diversos tipos de cirurgias orais com bons resultados (DESIATE *et al.*, 2009).

Tendo em vista o potencial de necrose do laser e de penetração nos tecidos, supõe-se que o laser possa ser testado como um adjuvante no tratamento de lesões odontogênicas, diminuindo a chance de recorrência por meio da necrose dos remanescentes com potencial recidivante.

10 CONCLUSÃO

O laser diodo apresenta-se como uma boa opção para o tratamento de diversas afecções da cavidade bucal e de outros sítios. O conhecimento do aparelho, de suas configurações e possibilidades é fundamental para uma correta utilização e eleição da terapia adequada para cada propósito.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a penetração do laser diodo em tecidos moles e duros de coelhos. Após essa avaliação, os resultados poderiam ter sido validados para a elaboração de um projeto para testes em humanos. Entretanto, as dificuldades técnicas relacionadas à perda de material para a análise histológica, inviabilizou (em parte) que conclusões mais significativas pudessem ser auferidas.

O presente trabalho permite concluir que a ação do laser diodo sobre os tecidos é proporcional à potência empregada no tecido. Mais estudos são necessários para que se obtenham parâmetros que permitam estabelecer protocolos de utilização do laser diodo, sobretudo em tecidos duros, com segurança.

REFERÊNCIAS

AHAD A, TANDON S, LAMBA AK, FARAZ F, ANAND P, ALEEM A. **Diode Laser Assisted Excision and Low Level Laser Therapy in the Management of Mucus Extravasation Cysts: A Case Series.** Journal of Lasers in Medical Science v.8, n.3, p.155-159, 2017.

AL-MORAISSI EA, DAHAN AA, ALWADEAI MS, OGinni FO, AL-JAMALI JM, ALKHUTARI AS, et al. **What surgical treatment has the lowest recurrence rate following the management of keratocystic odontogenic tumor?: A large systematic review and meta-analysis.** Journal of Craniomaxillofacial Surgery v.45, n.1, p.131-144 , 2017.

ÁLVAREZ-CAMINO JC, ESPAÑA-TOST AJ, GAY-ESCODA C. **Endoluminal sclerosis with diode laser in the treatment of orofacial venous malformations.** Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal v. 18, n.3, p.486-90, 2013.

AMARAL MBF, ÁVILA JMS, ABREU MHG, MESQUITA RA. **Diode laser surgery versus scalpel surgery in the treatment of fibrous hyperplasia: a randomized clinical trial.** International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery v.44 p.1383–9, 2015.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA). **AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals.** 2013 Edition. American Veterinary Medical Association, 2013. 102p.

ANDRADE A, PINTO SC, OLIVEIRA RS. **Animais de Laboratório Criação e Experimentação.** Ed. Fiocruz. Rio de Janeiro, 2002, 387p.

ANGIERO F, BENEDICENTI S, ROMANOS GE, CRIPPA R. **Treatment of hemangioma of the head and neck with diode laser and forced dehydration with induced photocoagulation.** Photomed Laser Surg. v.26, n.2, p.113-8, 2008.

ANVISA. **Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde /** Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 182p.

BOJ JR, POIRIER C, ESPASA E, HERNANDEZ M, JACOBSON B. **Eruption cyst treated with a laser powered hydrokinetic system.** Journal of Clinical Pediatric Dentistry. v.30, n.3, p.199-202, 2006.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. **Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016.**

BRASÍLIA. **Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados.** Editado pela Comissão de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal/CFMV, 2013.

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

CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). **Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA.** Resolução Normativa nº13 de 2013.

CUNHA JF, GOMES CC, MESQUITA RA, ANDRADE GOULART EM, CASTRO WH, GOMEZ RS. **Clinicopathologic features associated with recurrence of the odontogenic keratocyst: a cohort retrospective analysis.** Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology. v.121, n.6, p.629-35, 2016.

DESIATE A, CANTORE S, TULLO D, PROFETA G, GRASSI FR, BALLINI A. **980 nm diode lasers in oral and facial practice: current state of the science and art.** International Journal of Medical Sciences. v.6, p.358-64, 2009.

FISHER DM, CHANG C-J, CHUA J-J, CHEN Y-R, ACHAUER BM. **Potential Complications of Intralesional Laser Photocoagulation for Extensive Vascular Malformations.** Annals of Plastic Surgery. v47, p.252–256, 2001.

GENOVESE WJ, SANTOS MTBR, FALOPPA F AND MERLI LAS. **The Use of Surgical Diode Laser in Oral Hemangioma: A Case Report.** Photomedicine and Laser Surgery. v.28, n.1, p.147-51, 2010.

GOHARKHAY K, MORITZ A, WILDER-SMITH P, SCHOOP U, KLUGER W, JAKOLITSCH S, et al. **Effects on Oral Soft Tissue Produced by a Diode Laser In Vitro.** Lasers in Surgery and Medicine. v.25, p.401-6, 1999.

GREEN J, WEISS A, STERN A. **Lasers and Radiofrequency Devices in Dentistry.** Dental Clinics of North America. v.55, p.585–97, 2011.

GUPTA S, KUMAR S. **Lasers in dentistry – an overview.** Trends in Biomaterials & Artificial Organs. v.25, n.3, p.119-23, 2011.

GUPTA A, BANSAL P, SHARMA R, SHARMA SD. **Treatment of Keratocystic Odontogenic Tumours: A Prospective Study of 30 Cases.** Journal of Maxillofacial and Oral Surgery. v.15, n.4, p.521-7, 2016.

GUTTENBERG SA, EMERY III RW. **Laser physics and tissue interaction.** Oral & Maxillofacial Surgery Clinics of North America. v.16, p.143–7, 2004.

HAQ J, SIDDIQUI S, MCGURK M. **Argument for the conservative management of mandibular ameloblastomas.** British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. v.54, n.9, p.1001-5, 2016.

HAVEL M, BETZ CS, LEUNIG A, SROKA R. **Diode Laser-Induced Tissue Effects: In Vitro Tissue Model Study and In Vivo Evaluation of Wound Healing Following Non-Contact Application.** Lasers in Surgery and Medicine. v.46, p.449–55, 2014.

HERNANDEZ-DIVERS SJ. **Diode laser surgery: principles and application in exotic animals.** Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine. v.11, n.4, p.208-20, 2002.

HUDSON DE, HUDSON DO, WININGER JM, RICHARDSON BD. **Penetration of Laser Light at 808 and 980 nm in Bovine Tissue Samples.** Photomedicine and Laser Surgery. v.31, n.4, p.163–8, 2013.

ISOLA G, MATARESE G, GIUDICE G, BRIGUGLIO F, ALIBRANDI A, CRUPI A, et al. **A New Approach for the Treatment of Lateral Periodontal Cysts with an 810-nm Diode Laser.** The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry. v. 37, n.1, p.120-129, 2017.

JASPER J, CAMILOTTI RS, PAGNOCELLI RM. **Treatment of lip hemangioma using forced dehydration with induced photocoagulation via diode laser: report of three cases.** Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology. v.119, p.89-94, 2015.

JAYASREE RS, GUPTA AK, BODHEY NK, MOHANTY M. **Effect of 980-nm Diode Laser and 1064-nm Nd:YAG Laser on the Intervertebral Disc-In Vitro and in Vivo Studies.** Photomedicine and Laser Surgery. v.24, n.4, p:547-52, 2009.

KRAVITZ ND, KUSNOTO B. **Soft-tissue lasers in orthodontics: an overview.** American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.v.133, n.4, p.110-4, 2008.

LEDDERHOF NJ, CAMINITI MF, BRADLEY G, LAM DK. **Topical 5-Fluorouracil is a Novel Targeted Therapy for the Keratocystic Odontogenic Tumor.** Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. v.75, n.3, p.514-524, 2016.

LEE PK, SAMMAN N, NG IO. **Unicystic ameloblastoma - use of Carnoy's solution after enucleation.** International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. v. 33, p.263–267, 2004.

LEUNG YY, LAU SL, TSOI KY, MA HL, NG CL. **Results of the treatment of keratocystic odontogenic tumours using enucleation and treatment of the residual bony defect with Carnoy's solution.** International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. v.45, n.9, p.1154-8, 2016

MIYAZAKI H, KATO J, WATANABE H, HARADA H, HAKIZAKI H, TETSUMURA A, et al. **Intralesional laser treatment of voluminous vascular lesions in the oral cavity.** Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology. v.107, p.164-72, 2009.

NEUKAM FW, STELZLE F. **Laser Tumor Treatment in Oral and Maxillofacial Surgery.** Physics Procedia. v.5, p.91–100, 2010.

ROMANOS G, NENTWIG GH. **Diode laser (980 nm) in Oral and Maxillofacial Surgical procedures: Clinical observations based on clinical applications.** Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery. v.17, n.5, p.193-197, 1999.

ROMEO U, DEL VECCHIO A, RIPARI F, PALAIA G, CHIAPPAFREDDO C, TENORE G, VISCA P. **Effects of different laser devices on oral soft tissues: in vitro experience.** The Journal of Oral Laser Applications. v.7, n.3, p.155–159, 2007.

ROMEO U, PALAIA G, DEL VECCHIO A, TENORE G, GAMBARINI G, GUTKNECHT N. **Effects of KTP laser on oral soft tissues. An in vitro study.** Lasers in Medical Science. v.25, p.539–543, 2010.

SCHMIDT BL . **The use of liquid nitrogen cryotherapy in the management of the odontogenic keratocyst.** Oral & Maxillofacial Surgery Clinics of North America. v.15, p.393–405, 2003.

STOELINGA PJ. **The treatment of odontogenic keratocysts by excision of the overlying, attached mucosa, enucleation, and treatment of the bony defect with**

carnoy solution. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. v.63, n.11, p.1662-6, 2005.

STRAUSS RA, FALLON SD. **Lasers in contemporary oral and maxillofacial surgery.** Dental Clinics of North America. v.48, p.861–88, 2004.

TORRES MP, MATEO MM, ALBA LM. **Malformaciones venosas orofaciales de bajo flujo: esclerosis endoluminal con láser de diodo.** Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial. v.32, n.2, p.:64-70, 2010.

VESNAVER A, DOVSAK DA. **Treatment of large vascular lesions in the orofacial region with the Nd:YAG laser.** Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. v.37, p. 191-195, 2009.

VOORSMIT RACA. **The incredible keratocyst: a retrospective and prospective study [thesis].** Nijmegen: University of Nijmegen; 1984.

WLODAWSKY RN, STRAUSS RA. **Intraoral laser surgery.** Oral & Maxillofacial Surgery Clinics of North America. v.16, p.149–63, 2004.

WRIGHT JM, VERED M. **Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumors.** Head Neck Pathology. v.11, n.1, p.68-77, 2017.

***Declaration Form**

Journal: INTERNATIONAL JOURNAL OF ORAL & MAXILLOFACIAL SURGERY

Title of Paper: "Analysis of the effects of diode laser on New Zealand rabbits soft and hard tissues. A preliminary study."

Declarations

The following additional information is required for submission. Please note that failure to respond to these questions/statements will mean your submission will be returned to you. If you have nothing to declare in any of these categories then this should be stated.

Please state any conflict of interests. A conflict of interest exists when an author or the author's institution has financial or personal relationships with other people or organisations that inappropriately influence (bias) his or her actions. Financial relationships are easily identifiable, but conflicts can also occur because of personal relationships, academic competition, or intellectual passion. A conflict can be actual or potential, and full disclosure to The Editor is the safest course.

Competing Interests

This paper has no financial or other relationship that might lead to a conflict of interest.

Please state any sources of funding for your research

The work was supported by FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

DOES YOUR STUDY INVOLVE HUMAN OR ANIMALSUBJECTS? Please cross out whichever is not applicable

YES

NO

If your study involves human or animal subjects or records of human patients you MUST have obtained ethical approval. Ethics approval or exemption are required for retrospective studies on patients' records

☆ International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery

Caixa de Entrada - Google 17:44



Submission Confirmation for Analysis of the effects of diode Laser on mandibular New Zealand rabbit bone. A preliminary study

Para: Dr. Aécio Abner Campos CRO/MG 39.338, aecio.abner@newtonpaiva.br,

Responder A: International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery

Dear Dr. Pinto Jr,

We acknowledge, with thanks, the receipt of your manuscript submitted to International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/ijoms/>. Your username is Your username is: aeciocampos@gmail.com.

If you need to retrieve password details,
please go to: http://ees.elsevier.com/ijoms/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned. Your paper will then be forwarded to the expert reviewers of the Editorial Board for review. Once the results of the reviewing process are available we will advise you.

Thank you for showing your interest in publishing in the International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.

Kind regards,

Jacqui Merrison
IJOMS Editorial Office

Elsevier Editorial System(tm) for
International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Analysis of the effects of diode Laser on mandibular New Zealand rabbit bone. A preliminary study

Article Type: Research Paper

Keywords: Lasers, Semiconductor; Epithelium; Conective tissue; Bone.

First Author: Aecio Campos Pinto Jr, DDS

Order of Authors: Aecio Campos Pinto Jr, DDS; Lucas G Abreu, PhD; Ricardo A Mesquita, PhD; Vanessa F Bernardes, PhD

Abstract: "LASER" is an acronym for Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation. The diode laser is one of this emerging tool and has great applicability in Dentistry. The literature about this type of laser is wide but there is no consensus about its penetration in different tissues and the effects caused by laser-tissue interaction. The aim of this study was to evaluate the laser effects on tissues and its penetration in both soft and hard tissues of New Zealand rabbits. It was realized an experiment with 18 animals ex vivo. After the euthanasia, samples of oral mucosa and mandibular bone was acquired. The tissues were marked in areas for receiving the laser therapy in two different periods (G1 and G2). The equipment was set in 4.5W. It was obtained 08 samples of each irradiated tissue. Histological analysis revealed that soft tissues of G2 (higher energy of laser) presented bigger tissue damage. The depth of laser penetration on the bone tissue was analyzed and resulted in measurements of 13,52 μm (G1) and 10,32 μm (G2) Statistical analysis of bone samples did not reveal a significant difference ($p = 0,123$) between G1 and G2 regarding laser penetration on evaluated tissues.

Please add a statement to confirm that all authors have viewed and agreed to the submission

INTERNATIONAL JOURNAL OF ORAL & MAXILLOFACIAL SURGERY
CONFIRMATION OF AUTHORSHIP FORM

Title of Submission: Analysis of the effects of diode laser on New Zealand rabbits soft and hard tissues. A preliminary study.

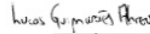
Contributing Authors :

Author: (surname and initials)
1. Pinto Jr. AAC

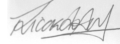
Signature (Mandatory)



2. Abreu LG



3. Mesquita RA



4. Bernardes VF



"I warrant that all the authors listed above have made a significant contribution to this manuscript and have agreed to its submission to the IJOMS".

Signed (corresponding author)



Name and Title of Corresponding Author:
Vanessa Fátima Bernardes (DDS, MSc PhD)

This form can be downloaded from the Guide to Authors (<http://ees.elsevier.com/ijoms>) and must be signed by all authors. This signed form must be submitted prior to acceptance of your manuscript.

The form can either be scanned and uploaded into your submission, or alternatively, faxed to 01865 843992, or sent by post to the following address :-

IJOMS Editorial Office
c/o Jacqui Merrison
Elsevier Limited
The Boulevard
Langford Lane
Oxford
OX5 1GB

This information must also be inserted into your manuscript under the acknowledgements section prior to the References.

***Manuscript**

[Click here to view linked References](#)

Diode laser effects and tissue penetration

1 Title: Analysis of the effects of diode laser on New Zealand rabbits soft and hard
2 tissues. A preliminary study.

3

4 ¹Aécio Abner Campos Pinto Júnior (DDS)

5 ²Lucas Guimarães Abreu (DDS, MSc, PhD)

6 ¹Ricardo Alves Mesquita (DDS, MSc, PhD)

7 ³Vanessa Fátima Bernardes (DDS, MSc PhD)

8

9 ¹ Department of Oral Clinics, Oral Pathology and Oral Surgery - Federal University of
10 Minas Gerais - Brazil.

11 ² Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics - Federal University of Minas
12 Gerais - Brazil.

13 ³ Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de
14 Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

15

16 CORRESPONDING AUTHOR:

17 Vanessa Fátima Bernardes, Biological Sciences Institute (ICB)

18 Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha – Belo Horizonte/MG – Brazil. ZIP
19 code: 31270-901.

20 Telephone number: +55 31 3409-2477

21 e-mail: bernardesvf@icb.ufmg.br

22

23 Source of support: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais
24 (FAPEMIG)/Brazil.

25

26 Keywords: Lasers, Semiconductor; Epithelium; Connective tissue; Bone.

27

Diode laser effects and tissue penetration

28 ABSTRACT

29

30 "LASER" is an acronym for Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation.

31 The diode laser is one of this emerging tool and has great applicability in Dentistry. The

32 literature about this type of laser is wide but there is no consensus about its penetration

33 in different tissues and the effects caused by laser-tissue interaction. The aim of this

34 study was to evaluate the laser effects on tissues and its penetration in both soft and

35 hard tissues of New Zealand rabbits. It was realized an experiment with 18 animals ex

36 vivo. After the euthanasia, samples of oral mucosa and mandibular bone was acquired.

37 The tissues were marked in areas for receiving the laser therapy in two different periods

38 (G1 and G2). The equipment was set in 4.5W. It was obtained 08 samples of each

39 irradiated tissue. Histological analysis revealed that soft tissues of G2 (higher energy of

40 laser) presented bigger tissue damage. The depth of laser penetration on the bone tissue

41 was analyzed and resulted in measurements of 13,52 μm (G1) and 10,32 μm (G2)42 Statistical analysis of bone samples did not reveal a significant difference ($p = 0,123$)

43 between G1 and G2 regarding laser penetration on evaluated tissues.

44

45

Diode laser effects and tissue penetration

46 INTRODUCTION

47 From 2005 to 2016 Odontogenic Keratocyst (OKC) was classified as a tumor, due to its
48 clinical behavior, the recurrence rate after treatment and *PTCH* gene mutations
49 associated with syndromic patients. However, recently this entity was reclassified as a
50 cyst again, by World Health Organization, because of missing evidence which could
51 justify its maintenance as a tumor¹. In fact, some cases of OKC are very aggressive and
52 recurrence rates vary from 8.4% to 32.3%, depending on the applied therap². Treatment
53 modalities include marsupialization, enucleation associated with adjuvant therapies and
54 resection²⁻⁵. All therapies aim for the diminishing of the recurrence rates, throughout the
55 elimination of microcysts and epithelial remnants which could originate a new lesion⁵.

56

57 LASER is an acronym for Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
58 and differs from other light sources due to its coherence, monochromaticity, high power
59 and collimation, which justify the clinical uses of this type of radiation⁶. There are many
60 different surgical lasers available such as carbon dioxide (CO₂), neodymium–yttrium–
61 aluminium–garnet (Nd:YAG), potassium–titanium–phosphorous (KTP) and diode
62 lasers with semiconductors⁷. Diode laser wavelength varies from 805 to 980 nm^{7,8} and
63 can be used as a pulsed or continuous mode in contact or noncontact mode, for oral
64 lesions treatment^{7,9} and oral surgery¹⁰. The effects of the lasers on tissues are variable,
65 according to the beam and tissue characteristics and then can be used differently for
66 many therapeutic purposes^{6,10,11}. The radiation could reach up to 4mm, in non-
67 pigmented tissue¹² and its penetration in bone tissues already was evaluated for
68 diagnostic purposes¹³ but never as a therapeutic tool in bone.

69 Thus, it is important to discuss possible new adjuvant therapies for OKC treatment,
70 aiming for less recurrence and with fewest complications rates. The aim of this study
71 was to evaluate and compare the penetration depth of the diode laser, on rabbits soft and
72 hard tissues.

73

74

Diode laser effects and tissue penetration

75 MATERIALS AND METHODS

76

77 **Study design**

78 Eighteen *ex-vivo* New Zealand rabbits (male and female), around 90 days of life, were
79 selected due to mandibles size which provides enough space for the manipulation. The
80 samples were obtained in partnership with the Prof. Hélio Barbosa Experimental Farm
81 (Igarapé, Brazil). The sample size was achieved based on a pilot study conducted in
82 animal carcasses obtained commercially and analyzed considering a confidence interval
83 of 95%. For the sample size calculation studies with some similarities were
84 compared^{14,15,16}. This study was approved by the Ethical Committee for Animal Use of
85 the Federal University of Minas Gerais (protocol 63/2017).

86

87 **Diode laser**

88 The 808 nm diode laser (Thera Lase Surgery; DMC Ltda, São Carlos, Brazil) was used
89 for bone radiation purposes, with an optical fiber of 400 µm, at a potency of 4.5 W in
90 continuous-wave mode.

91

92 **Surgical procedures**

93 Immediately after euthanasia, the rabbit's oral mucosa was bilaterally dissected and
94 marked with a punch 8 mm diameter incision. The rabbit's mandibular bone was also
95 dissected and sectioned in two pieces (right and left sides) and, in each side, one 2.8 mm
96 diameter bone defect was created using a cylindrical burr (Neodent®, Curitiba, Brazil)
97 (Figure 1), under abundant irrigation with saline solution 0,9%. It was applied two
98 different therapies in each differently marked mucosa and bone defect, according to the
99 following groups: **G0** Control group: the soft and hard tissues was just marked with
100 punch and cylindrical burr; **G1**) Diode laser 1: radiation was applied until a clinical sign
101 of tissue whitening (on soft tissue) and darkening (on bone tissue) was observed and
102 then the emitted energy was noted; **G2**) Diode laser 2: radiation was applied until the
103 double energy delivered at the previous tissues was achieved; The mean time for the
104 surgical procedures in oral mucosa, mandibular bone, and laser application, after
105 euthanasia ranged from 15 to 30 minutes. At the end of the experiments, 8 samples of
106 each group were obtained. Surgical specimens were fixed in 10% buffered formalin,

Diode laser effects and tissue penetration

107 decalcified with nitric acid 5% and stained by hematoxylin-eosin for microscopic
108 evaluation.

109

110 **Histological analysis**

111 All specimens were analyzed on the electronic microscope. The depth of penetration
112 was evaluated and noted (Figure 2). All measures of each group were aligned, using a
113 table software (Microsoft Office Excel software, 2015) and considered together for
114 statistical analysis.

115

116 **Statistical analysis**

117 Data analysis was conducted using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS
118 for Windows, version 20.0 SPSS Inc., Armonk, NY, USA). The Kolmogorov-Smirnov
119 test demonstrated that quantitative data presented a non-normal distribution. Therefore,
120 the Mann-Whitney test was used for the evaluation of the difference between G1 and
121 G2. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

122

123 RESULTS

124 The total of 18 samples was obtained considering the three groups of soft tissue.
125 Considering this tissue analysis, the histological examination was divided in 05 grades:
126 Grade 0: negative control; Grade 1: tissue laser penetration until 1/3 of epithelial tissue;
127 Grade 2: tissue laser penetration until 2/3 of epithelial tissue; Grade 3: tissue laser
128 penetration completely through the whole epithelial tissue; Grade 4: tissue laser
129 penetration completely through the whole epithelial tissue and connective tissue
130 surface; Grade 5: tissue laser penetration completely through the whole epithelial tissue
131 and connective tissue until muscular plane. Approximately 50% of the samples reached
132 grade 4 and 5 of tissue penetration (Table 1).

133

134 Unfortunately, 05 samples of bone tissue, from each group, was lost during laboratory
135 procedures. Thus, the study ended with 03 samples of each laser group. Group 0: two
136 samples of the control group. Group G1 had 03 samples, presenting a penetration depth,
137 in bone tissue, ranged from 2.6 to 27.6 μm (mean 13.25 μm); group G2 penetration

Diode laser effects and tissue penetration

- 138 depth ranged from 1.8 to 23.4 μm (mean 10.32 μm). The groups were compared and
139 none of the comparisons achieved p -value < 0.05 . (Table 2)

Diode laser effects and tissue penetration

140 DISCUSSION

141 Stoelinga et al.⁵ propose three different options for OKC treatment. Treatments for
142 minimizing OKC recurrences, like Carnoy or Cryotherapy presents limitations and risks
143 to surrounding tissues⁵. It is known that all methods have its own limitations, but the
144 one with less adverse effects must be chosen. In order to solve this issue, we tested two
145 different therapies and purposed an alternative method for an adjuvant method in OKC
146 treatment.

147

148 The diode laser is commonly used for the treatment of oral lesions^{9,17,18} and in oral
149 surgery field¹⁰ but it was never used as an adjuvant method in OKC treatment. The
150 proposal of this study, for using diode laser, was based on several studies about
151 radiation penetration^{6,12,13,19} and the laser effects on tissues^{6,7,10,11,17}. There are studies
152 describing some advantages of diode laser treatment for tumors of oral and
153 maxillofacial region, as a hemostatic agent¹⁸. Diode laser has the potential for tissue
154 heating which leads to protein denaturation and carbonization²⁰. It is also known that
155 laser penetration depends on wavelength. The higher is the wavelength, the higher will
156 be its penetration¹⁹. Diode laser has a wavelength between 810-980 nm and its well
157 absorbed by soft tissue but poorly on hard tissues, like bone and teeth²¹. These
158 properties could have influenced the great absorption of diode light on soft tissue and
159 the difficulty of bone penetration or the tissue was lost due to the carbonization.

160

161 The purpose of this study was to evaluate the laser effects. It was evaluated that laser
162 can be harmful to the tissue if not correctly used. However, the laser light can reach
163 great depths especially in soft tissues.

Diode laser effects and tissue penetration

164 ACKNOWLEDGEMENTS

165 This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de
166 Minas Gerais (FAPEMIG)/Brazil. We are grateful to Prof. Walter Motta Ferreira and
167 PhD-researcher Felipe Norberto Alves Ferreira for their cooperation, to all members of
168 Prof. Hélio Barbosa Experimental Farm (Igarapé, state of Minas Gerais, Brazil) and Dr.
169 Bruno Parpinelli for supporting the experiments.

170

171 CONFLICT OF INTEREST

172 None.

173

174 ROLE OF THE FUNDING SOURCE

175 Support: FAPEMIG.

Diode laser effects and tissue penetration

177 REFERENCES

178

- 179 1) Wright JM1, Vered M. Update from the 4th Edition of the World Health
 180 Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and
 181 Maxillofacial Bone Tumors. *Head Neck Pathol.* 2017 Mar;11(1):68-77. doi:
 182 10.1007/s12105-017-0794-1.
- 183 2) Al-Moraissi EA, Dahan AA, Alwadeai MS, Oginni FO, Al-Jamali JM, Alkhutari
 184 AS, Al-Tairi NH, Almaweri AA, Al-Sanabani JS. What surgical treatment has
 185 the lowest recurrence rate following the management of keratocystic
 186 odontogenic tumor?: A large systematic review and meta-analysis. *J*
 187 *Craniomaxillofac Surg.* 2017 Jan;45(1):131-144. doi:
 188 10.1016/j.jcms.2016.10.013.
- 189 3) Leung Y.Y., Lau S.L., Tsoi K.Y., Ma H.L., Ng C.L. Results of the treatment of
 190 keratocystic odontogenic tumours using enucleation and treatment of the
 191 residual bony defect with Carnoy's solution. *Int. J. Oral Maxillofac.*
 192 *Surg.* 2016;45:1154–1158. doi: 10.1016/j.ijom.2016.02.002.
- 193 4) Gupta A, Bansal P, Sharma R, Sharma SD . Treatment of Keratocystic
 194 Odontogenic Tumours: A Prospective Study of 30 Cases. *J Maxillofac Oral*
 195 *Surg.* 2016 Dec;15(4):521-527. Epub 2016 Feb 13.
- 196 5) Stoelinga PJ. The treatment of odontogenic keratocysts by excision of the
 197 overlying, attached mucosa, enucleation, and treatment of the bony defect with
 198 carnoy solution. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Nov;63(11):1662-6.
- 199 6) Carroll L, Humphreys TR. Laser-tissue interactions. *Clinics in Dermatology*
 200 2006;24(1):2–7.
- 201 7) Romanos G, Nentwig GH. Diode laser (980 nm) in Oral and Maxillofacial
 202 Surgical procedures: Clinical observations based on clinical applications.
 203 *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery* 1999;17(5):193-197.
- 204 8) Gupta S, Kumar S. Lasers in dentistry – an overview. *Trends Biomater. Artif.*
 205 *Organs* 2011;25(3):119-23.
- 206 9) Amaral MBF, Ávila JMS, Abreu MHG, Mesquita RA. Diode laser surgery
 207 versus scalpel surgery in the treatment of fibrous hyperplasia: a randomized
 208 clinical trial. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2015;44:1383–9.

Diode laser effects and tissue penetration

- 209 10) Desiate A, Cantore S, Tullo D, Profeta G, Grassi FR, Ballini A. 980 nm diode
210 lasers in oral and facial practice: current state of the science and art. *Int. J. Med.*
211 *Sci.* 2009;6:358-64.
- 212 11) Romeo U, Del Vecchio A, Ripari F, Palaia G, Chiappafreddo C, Tenore G,
213 Visca P. Effects of different laser devices on oral soft tissues: in vitro
214 experience. *J Oral Laser Appl* 2007;7(3):155–159.
- 215 12) Hernandez-Divers SJ. Diode laser surgery: principles and application in exotic
216 animals. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine.* 2002;11(4):208-20.
- 217 13) Aziz SM, Khambatta F, Vaithianathan T, Thomas JC, Clark JM, Marshall R. A
218 near infrared instrument to monitor relative hemoglobin concentrations of
219 human bone tissue in vitro and in vivo. *Rev Sci Instrum.* 2010
220 Apr;81(4):043111. doi: 10.1063/1.3398450.
- 221 14) Saulacic N1, Stajcic Z, Stojcev Stajcic Lj, Piattelli A, Iizuka T, Lombardi T.
222 Effects of Carnoy's solution on blood vessels of the axillary fossa of rats. *Int J*
223 *Oral Maxillofac Surg.* 2009 Aug;38(8):876-9. doi: 10.1016/j.ijom.2009.04.001.
224 Epub 2009 May 7.
- 225 15) Pogrel MA, Regezi JA, Fong B, Hakim-Faal Z, Rohrer M, Tran C, Schiff T.
226 Effects of liquid nitrogen cryotherapy and bone grafting on artificial bone
227 defects in minipigs: a preliminary study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002
228 Jun;31(3):296-302.
- 229 16) Frerich B, Cornelius C-P, Wietholter H. Critical time of exposure of the rabbit
230 inferior alveolar nerve to Carnoy's Solution. *J Oral Maxillofac Surg*
231 1994;52:599-606.
- 232 17) Miyazaki H, Kato J, Watanabe H, Harada H, Hakizaki H, Tetsumura A, et al.
233 Intralesional laser treatment of voluminous vascular lesions in the oral cavity.
234 *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:164-72.
- 235 18) Neukam FW, Stelzle F. Laser Tumor Treatment in Oral and Maxillofacial
236 Surgery. *Physics Procedia* 2010;5:91–100.
- 237 19) Goharkhay K, Moritz A, Wilder-Smith P, Schoop U, Kluger W, Jakolitsch S et
238 al. Effects on Oral Soft Tissue Produced by a Diode Laser In Vitro. *Lasers in*
239 *Surgery and Medicine* 1999;25:401–406.

Diode laser effects and tissue penetration

- 240 20) Strauss RA, Fallon SD. Lasers in contemporary oral and maxillofacial surgery.
241 Dent Clin N Am 2004;48:861–88.
- 242 21) Kravitz ND, Kusnoto B. Soft-tissue lasers in orthodontics: an overview. Am J
243 Orthod Dentofacial Orthop. 2008;133(4):S110-4. doi:
244 10.1016/j.ajodo.2007.01.026.

ANEXO A - Parecer da CEUA-UFMG

08/08/2017

Email – vanbernares@hotmail.com

Decisão Final - Aprovado - Protocolo CEUA: 63/2017 (CEUA-UFMG)

ceua@prpq.ufmg.br

seg 07/08/2017 15:51

Para: bernardesvf@icb.ufmg.br <bernardesvf@icb.ufmg.br>; bernardesvf@hotmail.com <bernardesvf@hotmail.com>;



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 63/2017
Título do projeto: Penetração da solução de Carnoy e do laser de alta potência no tratamento de tecidos moles e duros da boca
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Vanessa de Fatima Bernardes
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Patologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 07/08/2017. Validade: 07/08/2017 à 06/08/2022
Belo Horizonte, 07/08/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br

