ADRIANA YURI TASHIMA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA MORFOLOGIA E DA CAPACIDADE DE
PARALISAÇÃO DE LESÕES INCIPIENTES DE CÁRIE ARTIFICIALMENTE
INDUZIDAS EM DENTES DECÍDUOS APÓS IRRADIAÇÃO COM LASER
DE Er:YAG**

São Paulo
2006

Adriana Yuri Tashima

**Avaliação *in vitro* da morfologia e da capacidade de paralisação
de lesões incipientes de cárie artificialmente induzidas em dentes
decíduos após irradiação com laser de Er:YAG**

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:
Odontopediatria

Orientadora: Profa. Dra. Ana Estela
Haddad

São Paulo
2006

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte e comunicado ao autor, a referência em que consta a citação.

Adriana Yuri Tashima

Assinatura

Instituição / Departamento: FOUSP / Departamento de
Ortodontia e Odontopediatria

Local e data:

Endereço:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tashima AY. Avaliação *in vitro* da morfologia e da capacidade de paralisação de lesões incipientes de cárie artificialmente induzidas em dentes decíduos após irradiação com laser de Er:YAG [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, / / 2006

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: _____

Dedico este trabalho

Aos meus pais, **ROSA e GOITI**, e minha irmã, **LUCIANA**,
por todo amor, incentivo, paciência e cooperação.
Obrigada por tudo que fizeram para que meu sonho se
tornasse realidade. Sem vocês eu não estaria aqui!

À DEUS,
por estar presente na minha vida, me protegendo,
iluminando meu caminho e me dando forças para que
eu possa atingir meus ideais.

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora, **Profa. Dra. Ana Estela Haddad**,
que mesmo à distância, esteve presente nos momentos necessários,
acreditando no meu trabalho, compreendendo e respeitando meu tempo,
limites e decisões. Admiro muito você, como pessoa e como profissional!

Aos meus "co-orientadores e anjos da guarda", **Fausto e Ricardo**,
pela ajuda, contribuição e pontos de vista "divergentes" que propiciaram o
desenvolvimento deste trabalho e meu crescimento científico.
Obrigada pelo apoio, amizade, carinho e força que vocês me deram em
todas as etapas deste trabalho. Adoro vocês!!!

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Guedes-Pinto**, a quem sempre admirei e respeitei como pessoa e profissional. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos, conversas e por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho no curso de pós-graduação.

À **Profa. Dra. Célia Regina Martins Delgado Rodrigues**, pelo carinho, amizade apoio, ensinamentos, paciência e disponibilidade que sempre me proporcionou em todos os momentos. Admiro muito você como pessoa e profissional!!!

À **Profa. Marcia Turolla Wanderley**, pelo carinho, apoio, amizade e presença em todos os momentos da minha vida profissional e pessoal. Seus ensinamentos e incentivos sempre contribuíram para o meu crescimento profissional. Obrigada por ser esta pessoa especial!

À **Profa. Dra. Maria Salete Nahás Pires Corrêa**, pelo grande exemplo de vida e dedicação à Ciência. Obrigada pela sua ajuda e orientação em muitos momentos!

Ao **Prof. Dr. José Carlos Petrossi Imparato**, pela competência, convivência, ajuda, oportunidades e ensinamentos recebidos.

Ao **Prof. Dr. Marcelo José S. Bönecker**, pelo incentivo, amizade e pelas palavras de apoio que foram muito importantes para mim!

À **Profa. Dra. Ana Lídia Ciamponi**, pela amizade, convivência e conhecimentos transmitidos, meus sinceros agradecimentos.

À **Profa. Dra. Claudia Perez Trindade**, pelo carinho, amizade, alegria e apoio durante todas as etapas da minha vida acadêmica!!!

Às minhas amigas, **Elaine, Gabriela, Cristiane, Suzana e Daniele**, pela presença em todos os momentos da minha vida. Obrigada pela amizade, apoio, carinho e estímulo que vocês sempre me deram. Vocês são pessoas muito importantes na minha vida!!!

Aos meus colegas de pós-graduação: **Alessandra, Anna Paula, Daniela, Fausto, Fernanda Moraes, Fernanda Nahás, Francisco, Luciana Butini, Luciana Sanglard, Marise, Monique, Ricardo, Sandra, Selma e Thiago**, pela amizade, convivência e inúmeros momentos de descontração e alegria que me proporcionaram durante estes dois anos.

Aos meus amigos **Cássio e Dani**, pelo apoio, amizade, companhia, ajuda e confiança no meu trabalho!!! Vocês são pessoas muito especiais na minha vida.

Ao **Thiago**, pela amizade, apoio e ensinamentos durante todo curso. Obrigada principalmente pela ajuda e pelas considerações durante a finalização deste trabalho.

À **Cris Zardetto**, pela pessoa especial que é, por estar sempre presente em vários momentos importantes do meu curso! Obrigada pela amizade, ajuda, apoio e carinho!!!

À **Fê Moraes, Lu Butini e Selma**, pela amizade, apoio e ajuda durante todo o curso. Obrigada por tudo!!!!

À **Glenda e Cristina**, pela amizade, apoio e força em vários momentos da minha vida!

À **Marize, Clemência, Fátima e Júlio**, funcionários da Disciplina de Odontopediatria da FOU SP, por estarem sempre dispostos a ajudar, pelo carinho, convivência, torcida e amizade!

Ao **Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo**, por permitir a utilização dos aparelhos de laser do Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO) da FOU SP.

À **Patrícia Freitas**, por compartilhar seu conhecimento e pela amizade, ajuda e paciência no esclarecimento das minhas dúvidas que foram essenciais para o engrandecimento de minha pesquisa.

À **Lili, Jô, Haroldo e Leila**, funcionários e estagiária do LELO - FOU SP, pela gentileza, amizade, ajuda, paciência e torcida nos momentos de dificuldade e durante o desenvolvimento da fase experimental.

À **Profa. Dra. Denise Zezell e Cebolinha**, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da USP, pela ajuda, disponibilidade e orientações.

Ao **Prof. Dr. Nicolau, Fernando, Douglas e às alunas da pós-graduação**, do Centro de Pesquisas em Biologia Oral do Departamento de Materiais Dentários da FOU SP, pela ajuda e por possibilitar a utilização do laboratório durante a fase experimental.

À **Rosa, Mirtes, Antônio e Silvio**, funcionários da Disciplina de Materiais Dentários da FOU SP, pela ajuda e atenção que sempre tiveram comigo!

À **Patrícia**, técnica da Disciplina de Patologia da FOSUP, pela ajuda, disponibilidade e competência durante a fase experimental.

À **Soninha e Arnaldo**, funcionários da Disciplina de Dentística da FOU SP, que sempre foram gentis comigo e me auxiliaram em vários momentos.

À **Cátia, Alessandra e Nair**, secretárias da Pós-Graduação da FOU SP, pela paciência e ajuda diante das dificuldades e conquistas desse período.

Ao **Issac, Rodolfo, Cecília e Jaqueline**, do Instituto de Geologia da USP, pela ajuda, atenção e utilização do laboratório.

À bibliotecária **Vânia**, obrigada pela ajuda na revisão e normatização das referências bibliográficas.

À **Solange**, pela confecção da ficha catalográfica.

Ao **Banco de Dentes Humanos** da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) e aos pacientes que doaram seus dentes decíduos e possibilitaram a realização deste estudo.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão da bolsa de estudo durante o curso de Pós-Graduação.

A **todas as pessoas** que, com as mais simples palavras, gestos e auxílio, me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

*“Quando amamos e
acreditamos do fundo de nossa
alma em algo, nos sentimos
mais fortes que o mundo, somos
tomados de uma serenidade
que vem da certeza de que
nada poderá vencer nossa fé.
Esta força faz com que sempre
tomemos as decisões certas, nas
horas certas, e quando
atingimos o nosso objetivo,
ficamos surpresos com nossa
própria capacidade”*

Paulo Coelho

Tashima AY. Avaliação *in vitro* da morfologia e da capacidade de paralisação de lesões incipientes de cárie artificialmente induzidas em dentes decíduos após irradiação com Laser de Er:YAG [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar a morfologia e a paralisação da progressão de lesões de cárie artificiais em esmalte após irradiação da superfície com laser de Er:YAG (KaVo Key II). A amostra (120 blocos de esmalte de dentes decíduos), submetida à ciclagem de pH durante 7 dias, foi dividida aleatoriamente entre as fases experimentais. Na fase morfológica os espécimes receberam os seguintes tratamentos: controle (C), laser focado (LC), laser desfocado 3mm (L3), laser desfocado 6mm (L6), e foram preparados para microscopia eletrônica de varredura. Para avaliação da efetividade do laser os espécimes foram divididos entre 9 grupos experimentais: controle negativo (CN), controle positivo (CP), laser focado (LC), laser desfocado 3mm (L3), laser desfocado 6mm (L6), aplicação tópica de flúor (F), LC mais flúor (LCF), L3 mais flúor (L3F) e L6 mais flúor (L6F). Os grupos foram submetidos a novo desafio cariogênico (exceto grupo CN) seguido de preparo para microscopia de luz polarizada. Os dados obtidos foram analisados usando os testes estatísticos ANOVA e LSD. Imagens com lupa estereoscópica também foram realizadas e o resultado submetido aos testes estatísticos Qui-quadrado, Exato de Fisher e teste de concordância. A

análise visual e morfológica mostrou ablação superficial da lesão de mancha branca irradiada no grupo LC, aumento de porosidade foi visualizado no grupo L3 assim como ausência de alteração morfológica no grupo L6. Os resultados da microscopia de luz polarizada mostraram que a irradiação do laser mais flúor impediu a progressão da cárie, nos grupos LCF, L3F e L6F e reduziu o corpo da lesão no grupo L6F. Pode-se concluir que a associação entre o laser de Er:YAG desfocado 6mm mais aplicação de flúor diminuiu a profundidade da lesão incipiente de cárie sem ocasionar alteração morfológica e que os demais grupos em que a associação entre laser e flúor estava presente foram efetivos na paralisação das lesões.

Palavras-Chave: Laser de Er:YAG; Mancha branca; Fluoretos tópicos; Dentes decíduos; Esmalte; Desmineralização.

Tashima AY. *In vitro* morphological assessment and inhibition of artificial incipient caries lesions after Er:YAG laser irradiation on primary teeth [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

The aim of this *in vitro* study was to evaluate the morphological effects of Er:YAG laser (KaVo Key II) irradiation on artificial enamel caries lesions and its ability to arrest the progression of these lesions. The sample (120 enamel blocks from primary teeth) was previously submitted to pH-cycling and then randomly divided into the groups. In the morphological analysis, the specimens were subdivided into 4 groups: control (C), focused laser (LC), defocused laser 3mm (L3), defocused laser 6mm (L6) and then prepared for scanning electron microscopy. To evaluate the effectiveness of the laser on incipient caries lesions, the specimens were divided into 9 groups: negative control (NC), positive control (PC), focused laser (LC), defocused laser 3mm (L3), defocused laser 6mm (L6), topical fluoride application (F), LC and fluoride (LCF), L3 and fluoride (L3F) and L6 and fluoride (L6F). All groups were submitted once again to pH cycling (except NC) and prepared for polarized light microscopy. ANOVA and LSD statistical tests were used. Images were also observed under stereoscopic loupe and were submitted to Chi-square test, Fishers' exact test and reproducibility assessment. Visual and morphological evaluations showed that superficial ablation was present on

the artificial white spot caries lesions in group LC, porosity increase in group L3 and no morphological alteration in group L6. Results under polarized light microscopy showed that laser irradiation and fluoride was able to arrest the caries progression in groups LCF, L3F and L6F and reduce the lesion's depth in L6F. In conclusion, it was detected that the association of Er:YAG defocused laser 6mm irradiation and fluoride was able to reduce the depth of the artificial incipient caries lesions without producing any morphological alteration and that the association of laser and fluoride was effective in arresting incipient caries lesions .

Uniterms: Er:YAG Laser; Dental white spots; Topical fluorides; Primary teeth; Enamel; Demineralization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1	Seleção e preparo da amostra para desenvolvimento de lesões artificiais de cárie incipiente.....	53
Figura 4.2	Diagrama do estudo preliminar: determinação dos parâmetros.....	56
Figura 4.3	Tratamento e preparo dos espécimes para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	60
Figura 4.4	Preparo dos espécimes para microscopia de luz polarizada.....	63
Figura 5.1	Imagens dos espécimes do grupo controle.....	68
Figura 5.2	Imagens dos espécimes do grupo laser de Er:YAG focado.....	69
Figura 5.3	Imagens dos espécimes do grupo laser de Er:YAG desfocado 3 mm.....	70
Figura 5.4	Imagens dos espécimes do grupo laser de Er:YAG desfocado 6 mm.....	71
Figura 5.5	Imagens obtidas através da lupa estereoscópica dos espécimes analisados (aumento 20X) e por microscopia de luz polarizada (aumento 20X) dos diferentes grupos experimentais.....	73
Figura 5.6	Gráfico representando as médias de profundidade das lesões (μm) nos diferentes grupos experimentais. Letras diferentes mostram diferença estatisticamente significativa entre os grupos	

($p < 0.05$) e a distância entre as barras denota os desvios
padrões.....74

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	<i>Determinação dos parâmetros utilizados em modo contato (n=2).....</i>	<i>55</i>
Tabela 4.2	Parâmetros do laser, valores das áreas e densidades de energia utilizadas.....	57
Tabela 4.3	Condições experimentais analisadas.....	58
Tabela 4.4	Descrição das condições experimentais propostas.....	61
Tabela 5.1	Comparação entre os grupos experimentais.....	66
Tabela 5.2	Número de amostras, médias e desvio-padrão da profundidade das lesões de cárie (μm) de cada grupo experimental.....	72
Tabela 5.3	Resultado da análise de Variância para verificar a influência dos tratamentos experimentais sobre a profundidade das lesões incipientes de cárie.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	controle
CP	controle positivo
CN	controle negativo
F	flúor
LC	laser de Er:YAG, modo focado (em contato)
LCF	laser de Er:YAG, modo focado, mais flúor
L3	laser de Er:YAG, modo desfocado, 3 mm
L3F	laser de Er:YAG, modo desfocado, 3 mm mais flúor
L6	laser de Er:YAG, modo desfocado, 6 mm
L6F	laser de Er:YAG, modo desfocado, 6 mm mais flúor
ATF	aplicação tópica de flúor
°C	grau Celsius
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CaF ₂	fluoreto de cálcio
CO ₂	dióxido de carbono
cm	centímetro
DES	solução desmineralizadora
Er,Cr:YSGG	érbio-cromo: ítrio-escândio-gálio-granada
Er:YAG	érbio: ítrio-alumínio-granada
Er:YSGG	érbio: ítrio-escândio-gálio-granada
g	grama(s)
h	hora

Hz	hertz
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
J	joule
J/cm ²	joule(s) por centímetro quadrado
KCl	cloreto de potássio
KOH	hidróxido de potássio
L	litro
M	molar
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
mg	miligrama
mJ	milijoule
mL	mililitro
mm	milímetro
NaH ₂ PO ₄	fosfato de sódio
Nd:YAG	neodímio: ítrio-alumínio-granada
nm	nanômetro
n	número
pH	logaritmo negativo da concentração hidrogeniônica (-log [H ⁺])
ppm	parte(s) por milhão
RE	solução remineralizadora
s	segundo
μ	micro
W	Watt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	p. 23
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1	Modelos de indução <i>in vitro</i> de lesões artificiais de cárie.....	27
2.2	Efeitos dos diferentes tipos de aparelhos de laser na prevenção da doença cárie.....	28
2.3	Laser de Er:YAG.....	31
3	PROPOSIÇÃO.....	44
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	Material.....	45
4.2	Métodos.....	49
4.2.1	características do laser de Er:YAG.....	50
4.2.2	preparo da amostra.....	50
4.2.2.1	<i>seleção e preparo dos dentes decíduos.....</i>	50
4.2.2.2	<i>criação das lesões artificiais de cárie.....</i>	51
4.2.3	estudo preliminar.....	54
4.2.4	análise morfológica.....	58
4.2.4.1	<i>lupa estereoscópica.....</i>	59
4.2.4.2	<i>microscopia eletrônica de varredura.....</i>	59
4.2.5	análise em microscópio de luz polarizada.....	61
5	RESULTADOS.....	65
5.1	Análise em Lupa Estereoscópica.....	65

5.2	Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura.....	66
5.3	Análise em Microscópio de Luz Polarizada.....	72
6	DISCUSSÃO.....	76
7	CONCLUSÃO.....	92
	REFERÊNCIAS.....	93
	APÊNDICE.....	102
	ANEXO.....	103

1 INTRODUÇÃO

O laser (acrônimo de light amplification by stimulated emission of radiation = amplificação da luz pela emissão estimulada de radiação) é uma tecnologia que vem sendo progressivamente incorporada na Odontologia, e sua utilização na Odontopediatria, Cirurgia, Dentística, entre outras especialidades, tem sido amplamente investigada.

No início, apenas Faculdades de Odontologia e centros de pesquisas podiam utilizar este recurso, pois o alto custo e tamanho dos primeiros equipamentos dificultavam sua aquisição. Com a evolução do conhecimento e difusão desta nova tecnologia na comunidade científica, a utilização na prática odontológica promoveu o surgimento de novos equipamentos tornando este recurso mais acessível e viável para ser utilizado no consultório tanto em tecidos moles, com os lasers de diodo, neodímio - Nd:YAG e dióxido de carbono – CO₂ (GOHARKHAY et al., 1999) quanto em tecidos duros com os lasers de CO₂ (FEATHERSTONE et al., 1998; RODRIGUES et al., 2004), Nd:YAG (BAHAR; TAGOMORI, 1994; KIMURA et al., 1997; TSAI et al., 2002), diodo (SANTAELLA et al., 2004; WETTER et al., 2002), érbio – Er:YAG e Er,Cr:YSGG (FREITAS, 2005; SCHWARZ et al., 2003; THEODORO et al., 2004) e CO₂ (KLEIN et al., 2005; WITTSCHER, 2001).

De acordo com o espectro de emissão e o comprimento de onda, os lasers podem estar na faixa do ultravioleta (abaixo de 400 nm), vermelho visível (620-780 nm) ou infravermelho (acima de 790 nm). Entre os tipos de

lasers usados na Odontologia temos o de argônio (488 ou 514 nm), CO₂ (9300; 9600 e 10600 nm), diodo (830; 980 nm), Nd:YAG (1064nm), Er:YAG (2940 nm), Er,Cr:YSGG (2790 nm) e hólmio - Ho:YAG (2120 nm) (COLUZZI, 2000; STABHOLZ et al., 2003; WITTSCHER, 2001).

O efeito da irradiação vai depender do comprimento de onda do laser e das características de absorção do tecido alvo. Ao atingir o tecido alvo, a luz poderá sofrer absorção, reflexão, espalhamento e/ou transmissão, resultando em diferentes efeitos terapêuticos (COLUZZI, 2000; PEARSON; SCHUCKERT, 2003; RODRIGUES et al., 2004; STABHOLZ et al., 2003).

Os lasers podem ser classificados em baixa potência, com efeitos não térmicos que podem ser fotoquímicos e fotofísicos gerando como resposta final efeitos fotobiológicos nos tecidos irradiados, e de alta potência, com efeitos térmicos produzindo coagulação, corte, vaporização, ablação e carbonização ou efeitos (EDUARDO; GOUW-SOARES; HAYPEK, 2002).

Uma das linhas de atuação do laser é na prevenção da cárie dentária. Tanto o laser de CO₂ (FEATHERSTONE et al., 1998; HSU et al., 2001; KLEIN et al., 2005; RODRIGUES et al., 2004; TSAI et al., 2002) quanto o de argônio (FLAITZ et al., 1995; HAIDER; WHITE; RICH, 1999; HICKS et al., 2003; HICKS et al., 2004; OHO; MORIOKA, 1990; WESTERMAN et al., 2002) tem apresentado bons resultados nessa área, sendo empregados para aumentar a resistência ácida do esmalte hígido frente ao desafio cariogênico.

Pesquisas utilizando outros comprimentos de onda, como Nd:YAG (HOSSAIN et al., 2001; MORIOKA; TAGOMORI, 1988), diodo (KATO, 2004; SANTAELLA et al., 2004), Er:YAG (FLAITZ et al., 1995; LIU; LIU; STEPHEN, 2006),

Er,Cr:YSGG (FREITAS, 2005), têm sido desenvolvidas para verificar a sua efetividade no controle da doença cárie.

Apesar do conhecimento científico alcançado sobre a doença cárie e da comprovada efetividade dos métodos preventivos atualmente disponíveis, a presença da lesão de mancha branca ainda é um quadro freqüentemente observado e representa o sinal clínico da presença de doença/atividade de cárie (TEN CATE, 2004). Neste estágio o controle é feito sem a necessidade de tratamento invasivo, pois a camada superficial do esmalte dentário ainda se mantém íntegra (BACKER-DIRKS, 1966).

Alguns trabalhos mostram a efetividade do laser aplicado, sobre superfície hígida, visando promover aumento da resistência do esmalte frente ao desafio cariogênico, de dentes bovinos ou em dentes permanentes humanos, porém poucos são os estudos envolvendo dentes decíduos.

Com exceção do estudo que utilizou o laser de neodímio em esmalte bovino (TAGOMORI et al., 1991) nenhum estudo, no entanto, avaliou a efetividade do laser de érbio na paralisação e até remineralização de lesões de mancha branca em dentes decíduos, motivando a realização do presente estudo para avaliar a efetividade do laser de Er:YAG na paralisação e possível remineralização de lesões de cárie incipientes artificiais em dentes decíduos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A primeira evidência clínica da presença da doença cárie na cavidade bucal é o aparecimento da lesão de mancha branca que é caracterizada pela presença da superfície externa aparentemente intacta, enquanto a subsuperfície apresenta-se desmineralizada.

Diante deste quadro de atividade de cárie, para que haja controle adequado, é fundamental inserir o paciente em um programa de promoção de saúde, ou seja, modificar os padrões de higiene (promover a desorganização do biofilme bacteriano), os hábitos alimentares (controlar a frequência de ingestão de alimentos cariogênicos) e associar o uso racional do flúor tópico com o controle profissional do biofilme para que se obtenha paralisação e/ou remineralização destas lesões.

Dentro deste contexto, o laser surgiu como uma alternativa para o controle da doença cárie, pois estudos realizados sobre o esmalte hígido sugerem que sua aplicação promove um aumento na resistência do esmalte frente ao desafio cariogênico.

Pesquisas realizadas com lasers de CO₂, Nd:YAG e argônio, associados ou não ao flúor tópico na forma de gel ou verniz, mostraram resultados favoráveis na paralisação da doença cárie. A aplicação do laser de Er:YAG e Er,Cr:YSGG na área da prevenção de cárie ainda é recente e poucos trabalhos foram até então publicados sobre o tema, sendo um campo ainda aberto para investigação. Muitos estudos mostraram aumento da resistência

ácida do esmalte hígido após irradiação com o laser (APEL et al., 2002a; APEL et al., 2004; BEVILACQUA, 2002; DELBEM et al., 2003; FLAITS et al., 1995; HAIDER; WHITE; RICH, 1999; OHO; MORIOKA, 1990), porém poucos estudos foram realizados sobre o esmalte desmineralizado (TAGOMORI et al., 1991).

Antes de indicar o uso clínico do laser, é importante que sejam desenvolvidas pesquisas *in vitro* de modo a avaliar a efetividade do laser sobre o esmalte e verificar se os parâmetros testados podem ocasionar possíveis danos ao tecido pulpar, causado pela elevação da temperatura na câmara pulpar, e ao tecido periodontal, o que inviabilizaria sua utilização.

2.1 Modelos de indução *in vitro* de lesões artificiais de cárie

Diversos são os modelos experimentais descritos na literatura que são utilizados para promover a formação *in vitro* de lesões de cárie (FEATHERSTONE, 1996), assim como para determinar a resistência ácida e possível capacidade de remineralização do esmalte submetido à irradiação do laser. Os modelos mais utilizados são os modelos de desmineralização, que utilizam tampão ácido, e os modelos de desmineralização e remineralização, através da ciclagem de pH.

No modelo de desmineralização as lesões de cárie em esmalte, são produzidas com o uso de um gel acidificado (pH entre 4,25 – 4,5 com adição

de ácido láctico) (FLAITZ et al., 1995; ISSA et al., 2003; WESTERMAN et al., 2002) ou solução de tampão lactato (pH 4,5) (CECCHINI, 2001; TSAI et al., 2002). Os períodos de tempo variam em cada estudo, de acordo com o desafio cariogênico que se deseja empregar.

O modelo de desmineralização e remineralização, através da ciclagem de pH, tem sido frequentemente citado nos estudos, pois simula melhor a condição presente na cavidade oral (ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003; DELBEM et al., 2003; FEATHERSTONE et al., 1998; ITTHAGARUN, WEI, 2000; KLEIN et al., 2005; MENDES; NICOLAU, 2004; TEN CATE; DUIJSTERS, 1982). Neste modelo a amostra é submetida a soluções desmineralizadoras (DES) e remineralizadoras (RE), alternadamente, para promover a formação das lesões de cárie sendo que, o período de ciclagem, varia de acordo com o desafio cariogênico que cada autor deseja desenvolver em seu estudo (Ex: 3h DES / 21h RE e 8h DES / 16h RE).

2.2 Efeitos dos diferentes tipos de aparelhos de laser na prevenção da doença cárie

Na odontologia, os aparelhos de laser apresentam diferentes indicações de uso de acordo com o comprimento de onda, densidade de energia (fluência), taxa de repetição (frequência) e tempo de exposição. Dependendo dos parâmetros escolhidos e das características e

propriedades ópticas de cada tipo de laser, os mesmos podem ser aplicados em tecidos moles ou tecidos duros.

O laser pode ser empregado no diagnóstico da cárie (por fluorescência), na remoção de tecido cariado, no tratamento da hipersensibilidade dentinária, no clareamento dental, na redução microbiana em tratamento periodontal e endodôntico, em cirurgia periapical, no controle de herpes labial e úlcera aftosa, mucosite e em cirurgia (EDUARDO; GOUW-SOARES; HAYPEK, 2002; PARKINS et al., 1991; PEARSON; SCHUCKERT, 2003; STABHOLZ et al., 2003; WITTSCHIER, 2001).

Na prevenção da doença cárie, os lasers também têm sido utilizados e avaliados para determinar sua efetividade no controle e/ou paralisação de lesões de cárie incipientes. Resultados positivos foram encontrados com os lasers de CO₂ e de argônio (FLAITZ et al., 1995; FEATHERSTONE et al., 1998; HAIDER; WHITE; RICH, 1999; HICKS et al., 2003; HICKS et al., 2004; KLEIN et al., 2005; TSAI et al., 2002; WESTERMAN et al., 2002).

O laser de diodo, muito utilizado em procedimentos cirúrgicos, também foi testado na prevenção de cárie, porém os resultados não foram favoráveis provavelmente devido à sua absorção limitada pelo tecido mineralizado. Alguns estudos mostraram que, após a irradiação do laser de diodo sobre o esmalte, áreas de fusão e ressolidificação com redução da rugosidade superficial e do diâmetro dos poros são observadas e que esta modificação poderia estar associada com o aumento da resistência do esmalte ao ataque ácido (EBEL, 2003; OLIVEIRA et al., 2001; WETTER et al., 2002). Porém quando foram realizados estudos sobre a efetividade do laser

de diodo em comparação ao verniz de flúor, sobre o esmalte de dentes humanos, observou-se que os resultados com os parâmetros experimentais testados não foram favoráveis e a aplicação tópica de flúor promoveu maior resistência frente ao desafio ácido do que o uso isolado do laser (KATO, 2004; SANTAELLA et al., 2004).

Há evidências na literatura que o laser de Nd:YAG também poderia ser empregado com resultados favoráveis na prevenção de lesões de cárie. Nas análises em microscópico de luz e eletrônico de varredura foi observado que a irradiação do laser de Nd:YAG, sobre o esmalte, promoveu fusão e ressolidificação, com ausência de formação de cavidade no esmalte (HOSSAIN et al., 2001; PELINO et al., 1999;). O aumento da resistência ácida do esmalte de dentes hígidos foi observado após uso de laser de Nd:YAG, tanto em associação ou não à aplicação de flúor tópico quanto com corantes fotoabsorvedores escuros como nanquim ou carvão (BAHAR; TAGOMORI, 1994; BOARI; ZECELL; EDUARDO, 1999; HOSSAIN et al., 2001; MORIOKA; TAGOMORI, 1988; MYAKI et al., 1998).

Poucos foram os estudos descritos na literatura que utilizaram o esmalte desmineralizado como substrato para análise da efetividade da irradiação do laser. Trabalhos com o laser de Nd:YAG, com metodologia semelhante à apresentada neste estudo, mostraram que a irradiação no esmalte desmineralizado com laser de Nd:YAG resultou em alta resistência ácida com remineralização da zona superficial do esmalte (TAGOMORI et al., 1991).

2.3 Laser de Er:YAG

Embora o laser de Er:YAG seja originalmente indicado para a remoção de tecido cariado e para preparos cavitários, sem causar injúrias térmicas aos tecidos remanescentes ou polpa (HIBST; KELLER, 1989), sua utilização para prevenção da formação de lesões de cárie com diferentes parâmetros também tem sido investigada.

A aprovação de sua utilização em preparos cavitários ocorreu em 1997, pela Food and Drug Administration (FDA), nos Estados Unidos (COZEAN et al., 1997; STABHOLZ et al., 2003), sendo o primeiro laser a ser aprovado para este procedimento podendo ser utilizado com segurança e efetividade. Pela grande absorção pela hidroxiapatita e água, este laser está indicado para ser aplicado em tecidos duros (FRENTZEN; KOORT, 1992; HIBST; KELLER, 1989).

Diversas pesquisas foram desenvolvidas na busca por parâmetros adequados do laser de Er:YAG, para utilização tanto em esmalte quanto em dentina, bem como sua associação com corantes e presença ou ausência de refrigeração também foram objetos de pesquisas principalmente quando se avaliavam alterações morfológicas do esmalte irradiado (BURKES et al., 1992; HOSSAIN et al., 2000; MORIOKA; TAGOMORI; OHO, 1991; SAKAKIBARA et al., 1994).

Diversos estudos têm buscado avaliar a resistência ácida do esmalte após irradiação com laser de Er:YAG e seu possível efeito preventivo. Resultados favoráveis, ou seja, maior resistência ácida do esmalte após

irradiação com o laser de Er:YAG, foram encontrados, embora não esteja ainda elucidado o mecanismo que leva ao aumento da resistência ácida ocasionado pela irradiação do laser (BEVILACQUA, 2002; CECCHINI, 2001; HOSSAIN et al., 2000; WATANABE et al., 1998).

A análise em MEV mostrou que as superfícies irradiadas do esmalte e da dentina apresentaram ablação dos tecidos dentais propiciando uma superfície rugosa que poderia contribuir para o acúmulo de placa bacteriana na região em comparação com uma superfície hígida (lisa). Assim o ideal seria que se conseguisse aumentar a resistência dental sem, no entanto, provocar irregularidades na superfície (BEVILACQUA, 2002).

Morioka, Tagomori e Oho (1991) analisaram os efeitos da resistência ácida do esmalte humano após irradiação com laser de Er:YAG (NEC Inc.) associado ou não a corantes brancos e pretos. As condições analisadas neste estudo foram: energia variando de 0,39 – 0,92 J, diâmetro do feixe de 3 mm e taxa de repetição de 10, 2 e 1 Hz. Após irradiação, a amostra foi exposta a 50 ml de gel tampão lactato (pH 4,5), 37°C, com posterior análise por microrradiografias. A energia de 0,39 J e 10 Hz promoveu alta redução da descalcificação tanto com ou sem corante enquanto a energia de 0,92 J e 2 Hz produziu resistência ácida apenas com o corante. Na análise de microscopia eletrônica de varredura observou-se que a superfície irradiada sem corante estava rugosa. Quando os corantes foram comparados, foi observado que a superfície que recebeu irradiação com corante branco obteve alteração moderada em comparação com o corante preto. Os autores concluíram que o laser de Er:YAG produziu resistência ácida

significante e que apesar do corante preto produzir maior resistência, o uso do corante branco produziu menor dano ao esmalte.

Watanabe et al. (1998) analisaram a susceptibilidade do esmalte dental à dissolução ácida após irradiação de laser de Er:YAG (Erwin). As especificações deste laser foram comprimento de onda 2,94 μm , energia de saída 30-350 mJ, taxa de repetição 1; 3,3; 5 e 10 Hz, energia de 25, 50, 100 e 150 mJ, com 5 disparos, sob irrigação de água (4 cc/min), usando sonda em contato e ângulo de irradiação de 45° contra a superfície dentária. Após irradiação os dentes foram colocados em solução desmineralizadora de tampão lactato (pH 4,5) durante 4 dias. Microrradiografia, MEV e análise dispersiva de raios x foram utilizadas neste estudo. Os resultados mostraram que o esmalte irradiado apresentava defeito. A resistência ácida foi observada na superfície de esmalte irradiado sendo melhor com 50 mJ. Os resultados mostraram que este laser pode ser utilizado para prevenção, porém outras avaliações devem ser realizadas para determinar o mecanismo de resistência ácida pela irradiação do laser.

Hossain et al. (2000) avaliaram o efeito da irradiação do laser de Er:YAG (400 mJ; 2 Hz; 5 s), com ou sem refrigeração de água, na resistência ácida do esmalte hígido. Após irradiação as amostras foram submetidas a uma solução de ácido láctico (pH 4,8) a 36°C, durante 24 h. A quantidade de íons cálcio presentes na solução foi determinada pela espectrometria de absorção atômica e a análise superficial, pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados deste estudo mostraram que a menor quantidade de cálcio foi obtida das amostras irradiadas sem refrigeração e

que na ausência de água ocorreu fusão do esmalte, diferente da amostra irradiada refrigerada com água, cuja superfície do esmalte apresentou prismas mais evidentes. Os autores concluíram que a irradiação com laser de Er:YAG, com ou sem refrigeração de água, foi efetiva na prevenção da cárie porém os resultados mostraram que a ausência de refrigeração promoveu maior resistência à desmineralização.

Hsu (2000) realizou irradiações com diferentes parâmetros do laser de Er:YAG no esmalte para determinar a densidade de energia limite necessária para obter um efeito destrutivo na superfície do esmalte. Os espécimes irradiados com energia de 60 mJ, 2 Hz, a 1 mm de distância, com 3-4 pulsos, sendo posteriormente submetidos ao modelo de ciclagem de pH por 20 h em solução desmineralizadora (pH 4,5) e 4 h em solução remineralizadora (pH 7,0) durante 2 dias. A análise em microscopia de luz polarizada mostrou aumento na porosidade do esmalte causado pela desmineralização artificial e na concentração de carbonato na superfície do esmalte em direção à junção amelodentinária. A progressão da desmineralização foi interrompida na margem onde o esmalte foi irradiado demarcando áreas com o mesmo padrão do esmalte normal. Este fenômeno indicaria uma proteção contra a desmineralização induzida pelo laser. O autor concluiu que a irradiação com o laser de Er:YAG tem potencial para reduzir ou prevenir a desmineralização do esmalte dental.

Cecchini (2001) avaliou *in vitro* as alterações morfológicas e a resistência do esmalte dental à desmineralização por ácidos, após irradiação com laser de Er:YAG (KaVo Key II). O laser utilizado apresenta as

seguintes especificações, comprimento de onda de 2,94 μm , taxa de repetição de 1 a 15 Hz, energia de pulso variável entre 60 e 500 mJ e diâmetro do feixe de 0,63 mm para a peça de mão 2051, não contato, e 0,32 mm para peça de mão 2055, com fibra contato 2055 (50/10). A amostra, composta por terceiros molares, foi preparada e submetida a diferentes tratamentos (n=10): (a) 60 mJ; 2 Hz; 33,3 J/cm², ponta 2051, modo não contato; (b) 80 mJ; 2 Hz; 44,4 J/cm², ponta 2051, modo não contato; (c) 120 mJ; 2 Hz; 66,6 J/cm², ponta 2051, modo não contato; (d) 64 mJ; 2 Hz; 20 J/cm², ponta 2055, fibra 50/10, modo contato; (e) 86,4 mJ; 2 Hz; 26,9 J/cm², ponta 2055, fibra 50/10, modo contato; (f) 135 mJ; 2 Hz; 42,2 J/cm², ponta 2055, fibra 50/10, modo contato; (g) controle (esmalte hígido). Após a irradiação, as amostras foram submetidas a 2 ml de gel de tampão acetato (pH 4,5) durante 8 h. A análise por espectrometria mostrou aumento da resistência à desmineralização por ácidos com irradiações de 60 e 80 mJ, fibra não contato, e com 64,8 mJ, fibra contato, devido ao aumento das concentrações de cálcio e fósforo observado. Com relação à microscopia eletrônica de varredura, as irradiações promoveram uma superfície de esmalte rugosa, esbranquiçada, com ausência de zonas de fusão e ressolidificação e aspectos de favos de mel, bem como áreas sem alteração morfológica em locais onde não ocorreu a irradiação.

Apel et al. (2002a) avaliaram *in vitro* a solubilidade ácida do esmalte dental após irradiação subablasivas dos lasers de Er:YAG (2,94 μm) e Er:YSGG (2,79 μm). A influência da aplicação do flúor antes da irradiação do laser também foi avaliada. Para este estudo foram utilizados 294 blocos de

esmalte bovino (4 x 4 mm) divididos aleatoriamente em 14 grupos (n = 21): controle (CG), Er:YAG e Er:YSGG usando densidades de energia de 4; 6 e 8 J/cm² e os mesmos parâmetros foram repetidos após a imersão em solução de fluoreto de sódio 1% durante 15 minutos sendo que um grupo recebeu apenas tratamento de flúor. O equipamento testado era um sistema de laser experimental, Tipo 1-2-3 modular da Schwartz Eletro-Optics. Este sistema permitia a troca dos cristais de laser tornando possível a emissão de luz com comprimento de onda de 2,94 µm para o laser de Er:YAG e de 2,97 µm para o laser de Er:YSGG, ambos operando no modo free-running. As densidades de energia foram estabelecidas antes do início deste experimento. A frequência de 5 Hz e o tempo de exposição de 25 s, com total de 125 pulsos, foi aplicada em cada espécime. A seguir os espécimes foram desmineralizados em 3 ml de solução tampão acetato (pH 4,5). Os espécimes foram armazenados em banho de água com temperatura controlada de 37°C, durante 24 h, com agitação. Após este período, os espécimes foram removidos da solução desmineralizadora e o conteúdo de cálcio da solução foi determinado pela espectrometria de absorção atômica. Os resultados indicaram uma menor solubilidade do cálcio após a irradiação de densidades de energia maiores do laser. Maior diminuição da solubilidade foi observada com o laser de Er:YSGG a 8 J/cm² (redução de 20% em comparação com o grupo controle) porém as diferenças entre os grupos laser e o controle não foram estatisticamente significantes. Uma significativa redução do conteúdo de cálcio foi encontrada na solução desmineralizadora nos grupos que receberam flúor, e a adição do laser não

aumentaram a resistência ácida. Os autores concluíram que apesar do laser de érbio apresentar um potencial para aumentar a resistência ácida, sua aplicação exclusiva para prevenção de cárie não foi eficaz nas condições examinadas.

Bevilacqua (2002) avaliou *in vitro* a incorporação de flúor e a resistência ácida do esmalte dental bovino após irradiação com diferentes densidades de energia, com laser de Er:YAG pulsado (Opus 20), comprimento de onda de 2,94 μm , potência variando de 1 a 12 W, taxa de repetição de 7 a 12 Hz, diâmetro do feixe na região de contato de 1mm. Na primeira parte do experimento, 30 dentes foram submetidos a diferentes parâmetros de irradiação, abaixo e na faixa do limiar de ablação, seguidos pela análise em microscopia eletrônica de varredura para verificar as características morfológicas e se houve ablação ou não do esmalte. A irradiação em modo contato com 31,84 J/cm², provocou ablação do esmalte semelhante à observada após condicionamento com ácido fosfórico. As irradiações com 25,47 e 19,10 J/cm², modo contato, também produziram ablação com superfície mais irregular. As densidades de energia de 2,08; 1,8 e 0,9 J/cm² não produziram alterações morfológicas. Na segunda parte do experimento 80 amostras foram submetidas aos seguintes tratamentos: (a) controle – aplicação tópica de flúor fosfato acidulado (ATF); (b) condicionamento com ácido fosfórico a 37% seguido de ATF; (c) irradiação com 250 mJ; 7 Hz; 31,84 J/cm²; modo contato, seguido de ATF; (d) irradiação com 200 mJ; 7 Hz; 25,47 J/cm²; modo contato, seguido de ATF; (e) irradiação com 150 mJ; 7 Hz; 19,10 J/cm²; modo contato, seguido de ATF; (f)

irradiação com 250 mJ; 7 Hz; 2,08 J/cm²; distância 3,0 cm, modo não contato, seguido de ATF; (g) irradiação com 200 mJ; 7 Hz; 1,8 J/cm²; distância 2,6 cm, modo não contato, seguido de ATF; (h) irradiação com 100 mJ; 7 Hz; 0,9 J/cm²; distância 2,6 cm, modo não contato, seguido de ATF. Após receber os tratamentos propostos, a amostra foi submetida à 2 ml de solução de ácido acético (pH 4,5) durante 8 h. As soluções foram analisadas pela espectrometria de absorção atômica e espectrofotometria e os íons flúor, cálcio e fósforo foram quantificados. A autora concluiu que todos os grupos irradiados com laser antes do flúor foram melhores que o grupo controle com maior incorporação de flúor nos dentes irradiados com baixas densidades de energia (1,8 e 0,9 J/cm²). Diminuição na desmineralização do esmalte foi observada nos grupos que receberam tratamento com ácido fosfórico e irradiação com energia mais alta (31,84 J/cm²).

Delbem et al. (2003) analisaram *in vitro*, o efeito do laser de Er:YAG sobre o esmalte humano (terceiros molares extraídos) na formação de fluoreto de cálcio (CaF₂) após a aplicação de flúor e sua ação anticariogênica. O laser pulsado de Er:YAG (KaVo) de 2,94 µm foi utilizado com os seguintes parâmetros: feixe desfocado, sem spray, distância de 40 mm da superfície da amostra, energia de 60 mJ, taxa de repetição de 1 Hz, tempo de exposição de 10 s, feixe de saída de 0,63 mm, densidade de energia de 0,95 J/cm², duração de pulso de 250-500 µsec e peça de mão 2051. O flúor fosfato acidulado a 1,23% em gel (ATF) foi aplicado com cotonete, durante 4 minutos, seguido de enxágüe durante 1 minuto. Cento e vinte blocos de esmalte (3 x 3 mm) foram armazenados em solução de formaldeído 2%, em

temperatura ambiente, pH 7,0 e divididos para serem submetidos aos seguintes tratamentos (n = 30): (a) controle, (b) laser de Er:YAG, (c) ATF e (d) laser de Er:YAG + ATF. Oitenta blocos foram submetidos à ciclagem de pH durante 14 dias. Nos demais 40 blocos, o fluoreto de cálcio foi medido antes da ciclagem com desafio cariogênico alto sendo 10 dias com 20 ml de solução de desmineralização contendo cálcio 2,0 mM, fosfato 2,0 mM em tampão acetato 0,075 M, pH 4,3 durante 3 h e 10 ml de solução remineralizadora contendo cálcio 1,5 mM, fosfato 0,9 mM, KCL 150 mM em tampão Tris 0,1 M, pH 7,0 durante 21 h e nos finais de semana armazenados em solução remineralizante. Após a ciclagem de pH os blocos foram submetidos aos testes de microdureza superficial, microdureza em corte transversal e análise da concentração de flúor, na forma de fluoreto de cálcio. Os resultados mostraram que houve uma redução significativa na microdureza superficial em todos os grupos experimentais sendo que o grupo controle apresentou uma alta diminuição e o grupo laser de Er:YAG+ATF mostrou a menor diminuição. Os grupos ATF e laser de Er:YAG mostraram os mesmos resultados. A porcentagem do conteúdo mineral nas profundidades 10, 20 e 40 μm foi menor nos grupos controle e Er:YAG e maior nos grupos ATF e Er:YAG+ATF. A quantidade de CaF_2 depositado antes da ciclagem de pH foi maior no grupo ATF quando comparado ao grupo Er:YAG+ATF. Os grupos controle e laser de Er:YAG mostraram os menores valores. Os autores concluíram que após a irradiação do laser de Er:YAG no esmalte humano há menor perda mineral superficial e os resultados foram melhores com a associação do laser com o flúor. Além disso, relataram que a irradiação do

laser influencia na deposição de CaF_2 no esmalte, resultando em ação anticariogênica superficial, porém não em profundidade.

Apel et al. (2004) investigaram, *in situ*, o efeito de parâmetros subablasivos dos lasers de Er:YAG e Er:YSGG sobre o esmalte humano. Os voluntários utilizaram aparelho removível contendo três espécimes que sofreram os seguintes tratamentos: sem tratamento, Er:YAG com 6 J/cm^2 e Er:YSGG com 8 J/cm^2 ambos com 5 Hz e 125 pulsos durante 25 s (amostra = 18 espécimes). Metade da janela de $4 \times 6 \text{ mm}$ recebeu tratamento e a metade não tratada serviu como superfície controle. Os voluntários receberam orientação para removê-los durante a alimentação e higiene, sendo indicado uso de dentífrício sem flúor durante o período experimental. Após 7 dias, foi realizado teste de microdureza superficial com 4 indentações, com carga de 400 g e tempo de 10 s, para análise da desmineralização. Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa nos valores da microdureza antes e depois do período experimental, independente do tipo de aparelho de laser utilizado e da realização ou não de irradiação. Os autores concluíram que houve uma tendência de aumento na resistência à cárie após a irradiação subablasiva do laser de érbio.

Apel et al. (2005) analisaram os efeitos *in situ* da irradiação com densidades de energia subablasivas de laser de érbio na estrutura e na resistência ácida do esmalte dental pelo microscópio de varredura confocal a laser. Para isto, 12 espécimes ($4 \times 6 \text{ mm}$) foram divididos nos grupos experimentais sendo que três espécimes foram irradiados com Er:YAG (6

J/cm²) e três com Er:YSGG (8 J/cm²) ambos com 5 Hz e 125 pulsos, durante 25 s, sem refrigeração de ar ou água. Após tratamento os espécimes foram incluídos em aparelho removíveis para utilização durante 1 semana. Os voluntários receberam orientação para removê-los durante a alimentação e higiene e foi indicado uso de dentifrício sem flúor durante o período experimental. Os resultados da análise qualitativa com microscópio confocal mostraram finas fendas/rachaduras na superfície do esmalte que recebeu irradiação com os parâmetros analisados, porém sem características de ablação, em todos os espécimes, com ambos os lasers. Foi possível observar desmineralização em profundidade no esmalte. Superfícies não irradiadas apresentaram característica de desmineralização decorrente do desafio ácido, ou seja, as superfícies foram acometidas uniformemente mostrando sinais de desintegração do esmalte aprismático externo e estes efeitos foram menos pronunciados no esmalte irradiado. Os autores concluíram que as modificações (fendas) produzidas pelos parâmetros subablasivos do laser de Er:YAG analisados neste estudo impedem sua utilização para a prevenção da cárie, pois destroem a integridade da superfície do esmalte.

Liu, Liu e Stephen (2006) avaliaram quais os possíveis parâmetros, para a prevenção de cárie, induzida pelo laser de Er:YAG (Opus 20). Para isto, vinte e um molares humanos, sem cárie, foram utilizados neste estudo. Os dentes foram recobertos com esmalte de unha deixando duas janelas de 4 x 1 mm na superfície vestibular e lingual. O laser de Er:YAG, de comprimento de onda de 2,94 µm, foi utilizado com energias de 100, 200 e 300 mJ e respectivas densidades de energia de 12,7; 25,5 e 38,2 J/cm², sem água na

peça de mão, com 10 Hz e tamanho do spot de 1,0 mm. Como o tamanho da janela era de 4 x 1 mm e o spot focal do laser apresentava 1 mm de diâmetro, foi realizado 4 irradiações de 1 s cada. Estas energias, 100, 200 e 300 mJ, foram escolhidas baseados em estudos pilotos prévios destes autores, sendo considerados parâmetros subablasivos, visto que são muito menores que as energias utilizadas na remoção de cárie e no preparo cavitário, 600-700 mJ, e por não ocasionar danos à estrutura normal do dente. Após o tratamento com laser, cada dente foi dividido longitudinalmente, no sentido méso-distal, sendo recobertos com verniz de unha e secos durante 24 h. Um ciclo de pH de 2 dias foi realizado com 18 h em solução desmineralizadora e 6 h em solução remineralizadora com agitador com velocidade de 130 rpm a 37°C. A solução DES continha ácido acético a 0,05 M, íons cálcio 2,2 mM e fosfato 2,2 mM em pH 4,5 e a solução RE, de pH 7,0, continha cloreto de potássio 0,15 M, íons cálcio 1,5 mM, fosfato 0,9 mM e a troca das soluções era diária. Os espécimes foram acondicionados em potes plásticos com 100% de umidade. Após este período, secções de aproximadamente 120 µm de espessura foram obtidas. Água foi utilizada como solução de embebição, e as lâminas foram avaliadas no microscópio de luz polarizada e uma área representativa da lesão de cada fatia foi selecionada e medida. Os resultados da análise qualitativa mostraram que o esmalte irradiado pareceu não ser afetado e permaneceu indistinguível das áreas não tratadas e das tratadas com laser *spots*. Quando visualizada com lupa estereoscópica, a superfície do esmalte revelou-se sem cratera, rachadura ou melting (derretimento) e fusão. A análise quantitativa mostrou que, em comparação

com o grupo controle, o tratamento com laser de 100 e 200 mJ promoveu significativa proteção contra a desmineralização do esmalte, ao contrário do parâmetro de 300 mJ. A profundidade da lesão do grupo 200 mJ foi menor que do grupo 100 mJ apesar desta diferença não ser significativa. Os autores concluíram que a faixa de energia ideal para irradiação do Er:YAG foi estabelecida para promover a inibição da desmineralização do esmalte conseqüentemente a prevenção da cárie.

Como pode ser observado, os estudos da literatura mostraram que, dependendo do parâmetro utilizado, o laser foi capaz de promover aumento da resistência ácida do esmalte hígido. Estudos recentes investigam a utilização de parâmetros subablasivos do laser de Er:YAG para promover prevenção da doença cárie, porém parâmetros ideais ainda não foram estabelecidos. Além disso, nenhum trabalho foi realizado utilizando como substrato o esmalte desmineralizado de dente decíduo.

3 PROPOSIÇÃO

A proposição deste estudo *in vitro* foi:

1. determinar os parâmetros subablasivos de utilização do laser de Er:YAG para irradiação sobre lesões incipientes de mancha branca, artificialmente induzidas, no esmalte de dentes decíduos humanos;
2. comparar a efetividade do uso do laser de Er:YAG, isoladamente e associado à aplicação tópica de flúor, na paralisação destas lesões.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Foram utilizados, no presente trabalho, os seguintes materiais e equipamentos:

I. Equipamentos pertencentes ao Laboratório Especial de *Laser* em Odontologia (LELO) do Departamento de Dentística da FOUSP:

- Equipo Odontológico KaVo: micromotor, contra-ângulo, peça-reta, seringa tríplice e sugador a vácuo;
- Aparelho de *Laser* de Er:YAG (KaVo KEY II – Projeto FAPESP, Processo nº 97/10823-0) e óculos de proteção apropriado para este comprimento de onda.

II. Equipamentos pertencentes ao Departamento de Dentística da FOUSP:

- Labcut Modelo 1010 (Exttec);
- Disco de corte diamantado (Buehler);

- Discos de lixas abrasivas de carboreto de silício com diferentes granulações 120, 240, 400, 600, 1000, 1200, 4000 (Buehler Ltda.);
- Politriz Ecomet 3 (Buehler);
- Paquímetro digital (Mitutoyo).

III. Equipamentos pertencentes ao Centro de Pesquisas em Biologia Oral do Departamento de Materiais Dentários da FOUSP:

- Medidor de pH;
- Agitador magnético;
- Balança analítica.

IV. Equipamentos pertencentes ao Instituto de Geologia da USP:

- Lupa estereoscópica (ZEISS 475200/ 9001);
- Microscópio óptico Zeiss acoplado a uma câmera Sony, programa de análise de imagens Leica Qwin (Leica Microsystems)

V. Equipamentos pertencentes ao Departamento de Patologia da FOU SP:

- Aparelho de metalização Sputter Coater modelo FL 9496 (Balzers Union);
- Câmara de Vácuo (Pelco-2251).

VI. Equipamento pertencente ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares:

- Microscópio eletrônico de varredura Phillipps XL, série 30 (Eindhoven).

VII. Materiais utilizados:

- água destilada e deionizada;
- alta e baixa rotação;
- cera pegajosa (Kerr Corporation) e cera utilidade (Horus Dentsply);
- detergente à base de lauril-dietil éter sulfato de sódio (tergentol);
- disco diamantado;
- escova tipo Robson (KG Sorensen);
- éster de cianoacrilato em gel (Super Bond);
- glutaraldeído a 2% com tampão fosfato;
- filme laboratorial (parafilm)

- fita adesiva;
- flúor fosfato acidulado 1,23% gel (DFL);
- lâminas de microscópio (Projecta);
- lima endodôntica tipo K#30 (Maillefer);
- pedra pomes (SSWhite);
- potes plásticos de 25 ml;
- régua endodôntica milimetrada;
- resina cristal ortoftálica transparente (Redelease Produtos para Indústria Ltda);
- resina epóxica de secagem lenta (Araldite profissional, 24 horas);
- 2^{os} molares decíduos cedidos pelo Banco de Dentes Humanos - FOUSP;
- seringa de insulina;
- solução desmineralizadora contendo CaCl_2 (2,2 mM); NaH_2PO_4 (2,2 mM); ácido acético (0,05 M) com pH 4,8 ajustado com solução de KOH 1M, por litro de solução;
- solução remineralizadora contendo CaCl_2 (1,5 mM); NaH_2PO_4 (0,9 mM) e KCl (0,15 M) em pH 7,0 ajustado com KOH 1M, por litro de solução;
- solução salina a 0,9%;
- soluções de concentrações crescentes de álcoois (25%, 50%, 75%, 90%, 100%);

- suporte metálico para leitura em MEV (stubs - Electron Microscopy Sciences);
- verniz ácido resistente (esmalte de unha);
- vidrarias.

4.2 Métodos

Este estudo foi realizado em 2 etapas.

Na primeira parte foram testados diferentes parâmetros do aparelho de laser de Er:YAG, de modo a determinar quais poderiam ser aplicados sobre as lesões de cárie incipientes produzidas artificialmente sem que promovessem perda estrutural visível na superfície do esmalte irradiado.

Na segunda parte deste estudo foi verificado se os parâmetros determinados anteriormente para o laser de Er:YAG seriam efetivos na paralisação de lesões de manchas brancas artificiais quando comparados com a aplicação tópica de flúor isolada e com a associação dos métodos.

Esta pesquisa foi desenvolvida após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP - FOU SP) - Parecer de aprovação Protocolo 227/04 (Anexo A).

4.2.1 características do laser de Er:YAG

O laser de Er:YAG (modelo KaVo KEY Laser 2 – KaVo) emite no comprimento de onda de 2,94 μm , com taxa de repetição variando entre 1 e 15 Hz, energia de pulso variável entre 60-500 mJ, largura de pulso entre 250 e 500 μs , podendo ser utilizado em modo focado ou desfocado, associado com refrigeração através de spray de ar/água ou somente ar e feixe com diâmetro de 0,63 mm e 0,32 mm dependendo da peça de mão utilizada. Por trabalhar na faixa de espectro eletromagnético na região do infravermelho, não visível, o laser de érbio apresenta acoplado um laser guia de diodo de baixa potência, com comprimento de onda de 635 nm, vermelho, para facilitar a visualização do local de incidência do feixe.

4.2.2 preparo da amostra

4.2.2.1 seleção e preparo dos dentes decíduos

A amostra consistiu de 30 segundos molares decíduos provenientes do Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) (Fig. 4.1).

Os dentes obtidos foram escovados em água corrente, seguido de profilaxia na parte coronária com caneta de baixa rotação, escova de Robinson e pasta contendo pedra pomes e detergente à base de lauril-dietil éter sulfato de sódio seguido de lavagem abundante em água corrente. Após a secagem, os dentes decíduos foram observados em lupa com aumento de duas vezes, sendo excluídos da amostra os dentes que apresentassem trincas, restaurações, fluorose ou lesão de cárie na superfície.

Os dentes foram armazenados em soro fisiológico (trocado semanalmente) e mantidos sob refrigeração, até a realização da fase experimental.

4.2.2.2 criação das lesões artificiais de cárie

Os dentes decíduos selecionados foram cortados com disco diamantado, em baixa rotação, sob refrigeração com água, no sentido méso-distal e vestibulo-lingual, de modo a obtermos quatro espécimes a partir de cada elemento dentário (total = 120 espécimes).

Um retângulo de filme laboratorial de 2 mm de largura por 3 mm de comprimento foi cortado e colado no terço médio de cada espécime e, a seguir, a superfície foi recoberta com duas camadas de verniz ácido-resistente. Após secagem do verniz, os retângulos de filme laboratorial foram

removidos, de modo a deixar uma janela de 2 x 3 mm sem cobertura (Fig. 4.1).

Após este procedimento, os espécimes estavam prontos para serem submetidos ao processo de indução artificial de formação de lesões de cárie. Para este estudo foi escolhido o modelo de desmineralização e remineralização através de ciclagem de pH, de ten Cate e Duijsters (1982) modificado por Mendes e Nicolau (2004).

Neste modelo experimental, a amostra foi submetida a soluções alternadas de desmineralização e remineralização, durante 7 ou 14 dias ininterruptos, de acordo com a fase experimental, em temperatura ambiente e sem agitação (Fig. 4.1).

Os espécimes foram colocados individualmente em potes plásticos contendo 10 ml de solução desmineralizadora (DES) durante 8 h e a seguir, em 10 ml de solução remineralizadora (RE) durante 16 h, com trocas diárias sendo mantidas em temperatura ambiente. As soluções foram preparadas com água destilada e deionizada, mantidas sob refrigeração até o momento da utilização (Fig. 4.1).

Figura 4.1 - Seleção e preparo da amostra para desenvolvimento de lesões artificiais de cárie incipiente

4.2.3 estudo preliminar

Na literatura pudemos observar que quase todos os estudos relacionados com a utilização do laser na prevenção de cárie foram realizados sobre a superfície hígida, tanto em dentes bovinos quanto em dentes humanos permanentes e decíduos.

Sendo assim, na ausência de parâmetros ideais que pudessem ser indicados para utilização sobre lesões incipientes de cárie, um estudo preliminar para determinação de parâmetros que não provocassem danos superficiais sobre lesões incipientes de mancha branca foi necessário para a continuidade deste estudo. A intenção foi obter parâmetros subablasivos que não promovessem alterações morfológicas visíveis ou perda estrutural na superfície irradiada.

Nesta fase, 5 segundos molares decíduos foram utilizados (total = 18 espécimes). A seleção e preparo dos espécimes ocorreram conforme descrição acima e, inicialmente foi testado o modelo de ciclagem de pH para formação das lesões de cárie incipientes com duração de 14 dias. Este estudo se baseou inicialmente na metodologia e nos resultados obtidos por Bevilacqua (2002) e Cecchini (2001).

O laser de Er:YAG (KaVo KEY Laser II) foi utilizado com peça de mão 2055, fibra 50/10, ponta de prevenção, com diâmetro da fibra 0,47 mm, comprimento da fibra 10 mm e fator de transmissão 0,54.

Inicialmente os parâmetros discriminados na tabela 4.1 foram utilizados no modo focado, com incidência do feixe perpendicular à superfície do espécime, de modo a varrer toda a área delimitada, em apenas um sentido.

As energias de 60, 80 e 120 mJ também foram testadas com afastamento da fibra em 1 mm. A densidade de energia foi calculada para cada parâmetro por meio da fórmula descrita abaixo. Na irradiação em modo focado, a área da fibra foi considerada durante o cálculo.

$$\text{Densidade de Energia} = \frac{\text{Energia}}{\text{Área}}$$

Tabela 4.1 - Determinação dos parâmetros utilizados em modo focado (n=2)

Energia (mJ)	Energia de saída (mJ)*	Diâmetro (mm)	Área (cm ²)	Frequência (Hz)	Densidade de energia (J/cm ²)
250,00	135,00	0,47	1,7349 x 10 ⁻³	2	77,81
160,00	86,40	0,47	1,7349 x 10 ⁻³	2	49,80
120,00	64,80	0,47	1,7349 x 10 ⁻³	2	37,35
100,00	54,00	0,47	1,7349 x 10 ⁻³	2	31,12
80,00	43,20	0,47	1,7349 x 10 ⁻³	2	24,90
60,00	32,40	0,47	1,7349 x 10 ⁻³	2	18,67

* energia de saída = energia x fator de transmissão da fibra (0,54)

Como a ponta de prevenção 50/10 não apresenta saída de água, foi realizado refrigeração com ar da seringa triplice associado à sucção com bomba à vácuo durante a irradiação da amostra, seguindo as normas internacionais de utilização dos lasers de alta potência (CECCHINI, 2001; GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

Tanto na análise visual quanto em lupa estereoscópica com aumento de 20X, puderam ser observadas alterações morfológicas em todas as amostras, desde ablação superficial até cavitação, quando se utilizou o laser

no modo focado e no modo desfocado com distância de 1 mm entre o feixe e a superfície irradiada (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Diagrama do estudo preliminar: determinação dos parâmetros

Dada a necessidade de obtenção de parâmetros subablasivos para aplicação sobre as lesões de cárie incipientes artificiais e como energias menores que 60 mJ não poderiam ser programadas neste aparelho, alteração na área irradiada foi um artifício utilizado neste estudo pois deve-se lembrar que a densidade de energia é inversamente proporcional à área irradiada (quanto maior a área irradiada, menor a densidade de energia aplicada).

O aumento da área irradiada foi possível com maior distanciamento entre a ponta ativa do laser e a superfície irradiada sendo que as distâncias de 3 e 6 mm foram testadas neste estudo.

A área irradiada foi calculada a partir de 5 irradiações de cada distância (3 ou 6 mm) realizadas sobre papel carbono e o diâmetro de cada medida foi obtido com paquímetro digital. A média dos valores dos diâmetros foi determinada para obtenção da área irradiada e consequentemente cálculo da densidade de energia. Na tabela 4.2 estão discriminados os parâmetros que foram utilizados nas demais fases experimentais.

Tabela 4.2 - Parâmetros do laser, valores das áreas e densidades de energia utilizadas

Grupo	Distância do feixe (mm) / modo	Energia (mJ)	Diâmetro (cm)	Área (cm ²)	Densidade de energia (J/cm ²)	Taxa de repetição (Hz)
LC	focado	60*	0,047	$1,7349 \times 10^{-3}$ (fibra)	18,67	2
L3	3 mm, desfocado	60*	0,113	$10,0287 \times 10^{-3}$ (focada)	3,23	2
L6	6 mm, desfocado	60*	0,199	$31,1025 \times 10^{-3}$ (focada)	1,04	2

* energia do display (60 mJ por pulso) x fator de transmissão da fibra (0,54) = energia de saída (32,4 mJ).

Para padronização das distâncias, uma lima endodôntica foi utilizada como instrumento auxiliar, sendo presa à ponta de prevenção com fita adesiva, e antes de cada irradiação a medida foi confirmada com régua endodôntica, para evitar possíveis variações (NAVARRO, 2002).

4.2.4 análise morfológica

Nesta fase foi determinado a alteração morfológica superficial produzida por diferentes parâmetros do laser de Er:YAG, sobre lesões de cárie artificialmente induzidas no esmalte de dentes decíduos através da lupa estereoscópica e do microscópio eletrônico de varredura (MEV).

A amostra consistiu de 3 segundos molares decíduos (total = 12 espécimes) que foram preparados de acordo com descrição anterior. Nesta fase a ciclagem de pH foi realizada durante 7 dias com as mesmas soluções descritas anteriormente. A alteração na duração da ciclagem foi realizada, pois durante o estudo preliminar, foi possível visualizar pequenas perdas estruturais em alguns espécimes antes de serem submetidos aos tratamentos experimentais com laser de Er:YAG.

Após divisão aleatória dos espécimes, as seguintes condições experimentais foram realizadas (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Condições experimentais analisadas

Grupo (n=3)	Distância do feixe (mm)	Energia (mJ)	Densidade de energia (J/cm ²)	Taxa de repetição (Hz)
C	controle	-	-	-
LC	-	60	18,67	2
L3	3 mm	60	3,23	2
L6	6 mm	60	1,04	2

4.2.4.1 análise em lupa estereoscópica

Imagens dos espécimes antes e depois dos tratamentos experimentais foram obtidas com o auxílio da lupa estereoscópica (aumento 20X - Figuras 5.1a, 5.2a, 5.3a e 5.4a). A presença ou ausência de alterações superficiais visíveis foram analisadas por três examinadores cegos, pré-calibrados, e os dados foram submetidos aos testes estatísticos Qui-quadrado, Exato de Fisher e teste de concordância de Cohen's kappa (programa GMC versão 7.7).

4.2.4.2 microscopia eletrônica de varredura

Imediatamente após receber os tratamentos descritos acima, os espécimes foram imersos em glutaraldeído a 2% tamponado com fosfato durante 12 h (Fig. 4.3a). Posteriormente foram lavados com água destilada e desidratados com seqüência de soluções crescentes de álcool (25 a 100%) durante um dia (Fig. 4.3b).

Após secagem da amostra, inicialmente em capela e posteriormente na câmara à vácuo, os espécimes foram fixados nos stubs com éster de cianoacrilato em gel (fig. 4.3c), para posterior metalização com fina camada de ouro (Fig. 4.3d).

A amostra metalizada foi mantida em câmara de vácuo, para evitar umidificação, até realização da análise morfológica no microscópio eletrônico de varredura (Fig. 4.3e).

Grupos Experimentais (n=3)			
Controle	LC - Laser Er:YAG modo focado	L3 - Laser Er:YAG desfocado, 3 mm	L6 - Laser Er:YAG desfocado, 6mm

Preparo para MEV

Figura 4.3 - Tratamento e preparo dos espécimes para MEV

4.2.5 análise em microscópio de luz polarizada

Nesta fase foi realizada avaliação comparativa da efetividade de diferentes condições experimentais em promover a paralisação das lesões de cárie incipientes induzidas artificialmente.

A mesma seqüência de preparo da amostra e os mesmos parâmetros do laser de Er:YAG analisados na fase anterior foram aplicados em associação ou não com a aplicação tópica de flúor, sobre as lesões incipientes de cárie artificiais desenvolvidas.

Após divisão aleatória, a amostra (total = 90 espécimes) foi submetida aos tratamentos experimentais discriminados a seguir (tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Descrição das condições experimentais propostas

Grupo (n = 10)	Parâmetro	Energia (mJ) ¹	Taxa de repetição (Hz)	Densidade de energia (DE = J/cm ²)
CN	Controle negativo (lesão de cárie inicial - baseline)			
CP	Controle positivo (submetido a 2 ciclagens de pH, sem tratamento)			
F	Aplicação Tópica de Flúor*			
LC	focado	60	2	18,67
LCF	focado + F*	60	2	18,67
L6	desfocado, 6 mm	60	2	1,04
L6F	desfocado, 6 mm + F*	60	2	1,04
L3	desfocado, 3 mm	60	2	3,23
L3F	desfocado, 3 mm + F*	60	2	3,23

*1cc de flúor fosfato acidulado 1,23% durante 4 minutos.

¹ energia do display (60 mJ por pulso) x fator de transmissão da fibra (0,54) = energia de saída (32,4 mJ).

A irradiação com laser de Er:YAG seguiu os parâmetros definidos anteriormente e a aplicação tópica de flúor foi padronizada utilizando

seringa de insulina, portanto cada espécime recebeu 1 cc de flúor fosfato acidulado 1,23%, durante 4 minutos.

Após a realização dos tratamentos descritos acima, os grupos, com exceção do controle negativo, foram submetidos a novo ciclo de pH, por mais 14 dias. Após o término deste período os espécimes foram preparados para análise em microscopia de luz polarizada (Figura 4.4).

Os espécimes foram incluídos em resina cristal ortoftálica transparente (Fig. 4.4a). Após 24 h, a amostra foi seccionada em máquina de corte (Labcut) para obtenção de secções de aproximadamente 400 µm de espessura de cada espécime (Fig. 4.4b)

As secções, imersas em água, tiveram a face polida com lixa d'água de carboneto de silício granulação de 600 e 1200, sendo coladas em lâminas de microscópio com resina epóxica de secagem lenta e, após pressão leve, mantidas em estufa a 50°C, durante 24 h.

Após secagem da resina, a parte não polida foi desgastada inicialmente com lixas de carboneto de silício 120, 240, 400, 600 e 1000 em máquina politriz refrigerada por água seguida de desgaste manual com seqüência de lixas de carboneto de silício de números 1200, 2400 e 4000.

Cada secção foi desgastada visando obter secções com espessura de aproximadamente 100 µm, medidos com paquímetro digital (Fig. 4.4c).

As lâminas obtidas foram mergulhadas em água destilada por 24 h para posterior análise em microscópio óptico Zeiss com câmera digital Sony acoplado a um computador (Figura 4.4d).

Grupos Experimentais (n=10)		
CN – Controle Negativo	CP – Controle Positivo	F – Flúor

LC – Laser modo focado	L3 – Laser desfocado 3 mm	L6 – Laser desfocado 6 mm

LCF – Laser modo focado associado ao flúor	L3F – Laser desfocado 3 mm associado ao flúor	L6F – Laser desfocado 6 mm associado ao flúor

Nova Ciclagem de pH (14 dias)

Preparo para Microscopia de Luz Polarizada

Figura 4.4 - Preparo dos espécimes para microscopia de luz polarizada

O exame foi realizado com transmissão de luz polarizada (aumento de 100X) e placa de quartzo e a profundidade do corpo da lesão foi determinada pelo programa de análise de imagens Leica Qwin conforme descrição de Mendes e Nicolau (2004).

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelos testes de Normalidade Kolmogorov-Smirnov, Análise de Variância (ANOVA) e LSD. O nível de significância adotado para as análises foi de 5 %.

5 RESULTADOS

5.1 Análise em Lupa Estereoscópica

Nas imagens do grupo LC, obtidas com lupa estereoscópica (aumento de 20X) foi possível observar alterações visíveis, com características de ablação na superfície do esmalte que recebeu irradiação com laser de Er:YAG no modo focado (Figura 5.2a).

Neste mesmo aumento, não foi possível detectar alterações visíveis, após os diferentes tratamentos experimentais, nas superfícies dos espécimes dos grupos C (Figura 5.1a) e L3 (Figura 5.3a) e L6 (Figura 5.4a), com as densidades de energia estabelecidas por este trabalho.

O teste Qui-Quadrado mostrou que entre os grupos C x LC, LC x L6 e LC x L3 foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na alteração do esmalte após os tratamentos propostos ($p < 0,01$) (Tabela 5.1).

O teste exato de Fisher mostrou que as comparações entre os grupos C x L6, C x L3 e L6 x L3 não foram significantes ($p > 0,05$) (Tabela 5.1).

O teste de concordância de Cohen's kappa mostrou um alto grau de concordância inter-examinadores com valores variando de 0,936 a 0,968 (concordância quase perfeita).

Tabela 5.1 - Comparação entre os grupos experimentais

Grupos experimentais	Significância (p)
C x LC	p<0,01*
C x L6	p>0,05**
C x L3	p>0,05**
LC x L6	p<0,01*
LC x L3	p<0,01*
L6 x L3	p>0,05**

* Teste Qui-Quadrado

** Teste Exato de Fisher

5.2 Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura

Na fotomicrografia do grupo C pode-se visualizar a lesão de cárie incipiente artificial com irregularidade superficial, porosidade (Fig. 5.1e – aumento de 2000X) e perda estrutural sugestiva do início de cavitação (Fig. 5.1d – aumento de 2000X). Foi visualizado também áreas com esmalte desmineralizado sem alteração morfológica, mesmo com aumento de 4000X (Fig. 5.1f).

A fotomicrografia do grupo LC mostrou que a irradiação do laser de Er:YAG no modo focado sobre a lesão incipiente de cárie, não ocorreu de maneira uniforme pois, apesar de se tentar varrer toda a superfície delimitada, foi possível distinguir áreas irradiadas das áreas não irradiadas (Fig. 5.2c – aumento de 200X). A visualização do interior da área irradiada (*spot*) mostrou áreas com características de ablação, em diferentes profundidades (Fig. 5.2d – aumento de 500X). A lesão de cárie incipiente

irradiada mostrou padrão superficial irregular, com exposição dos centros ou da periferia dos prismas de esmalte, criando um aspecto similar a “favos de mel” (Fig. 5.2e – aumento de 2000X). Áreas não irradiadas presentes entre os *spots* mostraram o mesmo aspecto superficial observado na Fig. 5.1f, ou seja, ausência de alteração morfológica visível com o mesmo aumento (Fig. 5.2f – aumento de 4000X).

A fotomicrografia do grupo L3 sugere um aspecto superficial regular após irradiação, com laser de Er:YAG desfocado a uma distância de 3mm, sobre a lesão de cárie incipiente, criando um padrão morfológico homogêneo (Fig. 5.3d e 5.3e – aumento de 2000X, e 5.3f – aumento de 4000X). Nas fotomicrografias 5.3d e 5.3e observa-se exposição dos prismas de esmalte, similar ao padrão de desmineralização ácida. Imagem sugestiva de aumento da porosidade na superfície pode ser observado na Fig. 5.3f.

Na fotomicrografia do grupo L6 não foi observado alteração superficial após a irradiação com laser de Er:YAG desfocado a uma distância de 6mm, sobre a lesão de cárie incipiente (Fig. 5.4d e 5.4e – aumento de 2000X) e esta característica foi mantida mesmo em maior aumento (Fig. 5.4f – aumento de 4000X). Padrão morfológico homogêneo, com manutenção das características superficiais da lesão incipiente artificial, similar ao observado no grupo C (Fig. 5.1f) foi observado na Fig. 5.1f com o mesmo aumento (4000X).

Grupo Controle (C)	
<p>Inicial</p> <p>Final</p> <p>5.1a – imagem obtida com lupa estereoscópica (20X).</p>	<p>5.1b – visão geral do espécime (25X).</p>
<p>5.1c – interface entre o esmalte hígido (*) e lesão incipiente de cárie (*) (2000X).</p>	<p>5.1d – área com pequena perda estrutural (seta no início de cavitação – 2000X).</p>
<p>5.1e – presença de porosidade e superfície irregular (área delimitada - 2000X).</p>	<p>5.1f – esmalte desmineralizado, com ausência de alteração morfológica (4000X).</p>

Figura 5.1 - Imagens dos espécimes do grupo controle

Grupo Laser Er:YAG Focado (LC)

Inicial

Final

5.2a – imagem obtida com lupa estereoscópica (20X).

5.2b - visão geral do espécime (25X).

5.2c – irradiação não uniforme, sendo possível diferenciar áreas irradiadas (*) e não irradiadas (*) (200X).

5.2d – visão aproximada do interior da área irradiada sendo possível distinguir ablação em diferentes profundidades (500X).

5.2e – superfície irradiada com aspecto característico de favos de mel (2000X).

5.2f – área não irradiada da lesão de cárie incipiente (4000X).

Figura 5.2 - Imagens dos espécimes do grupo laser Er:YAG focado

Grupo Laser Er:YAG desfocado 3 mm (L3)

5.3a – imagem obtida com lupa estereoscópica (20X).

5.3b - visão geral do espécime (25X).

5.3c – interface entre esmalte hígido (*) e esmalte desmineralizado irradiado (*) (2000X)

5.3d – lesão de cárie incipiente irradiada (2000X).

5.3e – superfície irradiada em maior aumento (4000X).

5.3f – observar a porosidade presente no esmalte desmineralizado irradiado (seta) (4000X).

Figura 5.3 - Imagens dos espécimes do grupo laser de Er:YAG desfocado 3mm

Grupo Laser Er:YAG desfocado 6mm (L6)	
<p>Inicial</p> <p>Final</p> <p>5.4a – imagem obtida com lupa estereoscópica (20X).</p>	<p>5.4b - visão geral do espécime (25X).</p>
<p>5.4c - interface entre esmalte hígido (*) e esmalte desmineralizado irradiado (*) (2000X)</p>	<p>5.4d – lesão de cárie incipiente irradiada sem alteração morfológica visível (2000X).</p>
<p>5.4e – ausência de alteração morfológica na superfície irradiada (2000X).</p>	<p>5.4f – visão aproximada da imagem anterior (4000X).</p>

Figura 5.4 - Imagens dos espécimes do grupo laser de Er:YAG desfocado 6 mm

5.3 Análise em Microscópio de Luz Polarizada

Com o analisador de imagens foi possível realizar a detecção do corpo da lesão e medir a profundidade das lesões produzidas. Os resultados da profundidade das lesões de cárie nos diferentes grupos experimentais foram comparados e estão descritos a seguir (Fig. 5.5).

A diferença no número de espécimes de cada grupo experimental se deve a perdas durante o preparo das amostras para análise em microscópio de luz polarizada.

Os valores das médias e do desvio-padrão dos grupos experimentais ($p < 0,05$) e do Teste ANOVA (Análise de Variância) complementado pelo teste LSD estão descritos, respectivamente, nas tabelas 5.2 e 5.3.

Tabela 5.2 – Número de amostras, médias e desvio-padrão da profundidade das lesões de cárie (μm) de cada grupo experimental

Grupos Experimentais		n	Média	Desvio-padrão ($\pm$)
CP	(controle positivo)	10	260,5	60,5
CN	(controle negativo)	8	210,5	51,4
LC	(laser focado)	9	257,6	69,0
LCF	(laser focado flúor)	8	199,4	76,9
F	(flúor)	7	185,3	52,2
L6	(laser desfocado 6 mm)	10	213,3	41,5
L6F	(laser desfocado 6 mm flúor)	9	157,5	31,1
L3	(laser desfocado 3 mm)	10	199,9	36,5
L3F	(laser desfocado 6 mm flúor)	10	166,8	57,9

Tabela 5.3 – Resultado da análise de Variância para verificar a influência dos tratamentos experimentais sobre a profundidade das lesões incipientes de cárie

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrados médios	F	P
Entre grupos	94595,46	8	11824,43	4,00	0,0006
resíduo	212602,74	72	2952,82		
Total	307198,21	80

Figura 5.5 - Imagens obtidas através da lupa estereoscópica dos espécimes analisados (aumento 20X) e por microscopia de luz polarizada (aumento 20X) dos diferentes grupos experimentais

A Análise de Variância mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ao nível de 0,1% ($p = 0,0006$). Para determinar entre quais grupos esta diferença esteve presente foi aplicado o teste LSD (apêndice A e Fig. 5.6).

Profundidade das lesões (μm)

Figura 5.6 - Gráfico representando as médias de profundidade das lesões (μm) nos diferentes grupos experimentais. Letras diferentes mostram diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$) e a distância entre as barras denota os desvios padrões

De acordo com o gráfico, podemos observar que:

- a. O grupo CN apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) apenas em comparação com o grupo L6F;
- b. As lesões do grupo CP e o grupo LC foram significativamente maiores do que as lesões dos grupos LCF, F, L6F, L3 e L3F ($p < 0,05$);
- c. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo L6 e o L6F ($p < 0,05$);
- d. As demais comparações não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$);
- e. A comparação entre o grupo F e L6F foi estatisticamente significativa a nível de 5% porém comparados com o grupo CN, apenas o grupo L6F além de ser efetivo na paralisação da lesão incipiente de cárie, foi capaz de reduzir a profundidade da lesão;
- f. Os grupos LCF, F, L6F, L3 e L3F foram capazes de impedir a progressão da lesão de cárie incipiente (paralisaram a lesão de cárie).

6 DISCUSSÃO

Apesar da prevalência da doença cárie ter diminuído em alguns países, seu controle ainda representa um grande desafio para o profissional (FEATHESTONE, 1999). O uso racional do flúor está consagrado pela literatura como método preventivo no controle e/ou remineralização de lesões de mancha branca, sendo eficaz desde que integrado com modificações na dieta e na higiene e controle profissional do biofilme. Neste caso o flúor atua promovendo uma redistribuição de íons no corpo da lesão incipiente de cárie, criando um influxo de íons flúor e reduzindo a porosidade sub-superficial destas lesões (HOLMEN et al., 1986).

Dentro deste contexto, os lasers de alta potência têm sido testados em diferentes estudos que visam seu emprego como um método coadjuvante na prevenção da formação de novas lesões de cárie. Diferentes comprimentos de onda, equipamentos, tempos de aplicação, densidades de energia, modelos de desafio cariogênico e distâncias na irradiação tem sido testados (CLARKSON; RAFTER, 2001) na busca do protocolo ideal de utilização, que produza efeitos preventivos/terapêuticos, sem ocasionar efeitos colaterais indesejados. Por isso futuras investigações *in vitro* e *in situ* devem ser conduzidas visando obter um protocolo, para aplicação em ensaios clínicos, que seja seguro para ser recomendada na prevenção da

doença cárie na prática clínica (APEL et al., 2004; KAWASAKI; TANAKA; TAKAGI, 2000).

Na literatura consultada foi encontrado um único trabalho (TAGOMORI et al., 1991), com metodologia semelhante à utilizada neste estudo, que avaliou o efeito da irradiação do laser de Nd:YAG, e não do Er:YAG, na paralisação da progressão de lesões incipientes de cárie. Todos os demais estudos baseiam seus resultados na efetividade de diferentes comprimentos de onda do laser sobre o esmalte hígido de dentes bovinos ou humanos, decíduos ou permanentes (FLAITZ et al., 1995; HAIDER; WHITE; RICH, 1999; LIU; LIU; STEPHEN, 2006; OHO; MORIOKA, 1990). Alta resistência ácida e remineralização da zona superficial do esmalte desmineralizado, após irradiação com laser, foram obtidas nestes trabalhos.

No modelo experimental proposto neste trabalho, procurou-se comparar o efeito de um método já consagrado, que é a aplicação de tópica de flúor, com a irradiação do laser de Er:YAG, associado ou não ao flúor, na paralisação de lesões incipientes de cárie. Neste estudo a aplicação de tópica de gel de flúor fosfato acidulado 1,23% após a irradiação com laser de Er:YAG foi escolhida, pois estudos prévios mostraram que esta variável promovia maior resistência ácida, maior captação de fluoreto pelo esmalte quando comparado com a aplicação do flúor seguida do laser (TAGOMORI; MORIOKA, 1989) e superfície irradiada mais homogênea, com menor porosidade nas micrografias eletrônicas de varredura (HICKS et al., 2003). Além disso, quando foi comparada a redução

na profundidade da lesão de cárie, não foi observada diferença estatisticamente significativa, em relação ao momento de aplicação do flúor antes ou depois da irradiação do laser (FLAITZ et al., 1995).

Apesar das pesquisas envolvendo o laser de érbio, serem recentes, e da metodologia e dos parâmetros aplicados no presente estudo serem inéditos, o aumento na resistência ácida e da remineralização da zona superficial do esmalte das lesões de mancha branca foram resultados promissores encontrados neste estudo, principalmente quando a associação entre o laser e a aplicação tópica de flúor estava presente, da mesma forma que ocorreu quando outros estudos da literatura foram realizados na superfície hígida do esmalte (FLAITZ et al., 1995; HOSSAIN et al., 2001; LIU; LIU; STEPHEN, 2006). Estes resultados favoráveis apontam para a necessidade de estudos *in situ* e *in vivo* que possam confirmar sua aplicabilidade clínica no tratamento não invasivo de lesões de mancha branca de cárie.

Parâmetros maiores do que os testados nesta pesquisa têm sido empregados na remoção do tecido cariado e na realização de preparos cavitários, sem ocasionar elevação de temperatura a níveis críticos (acima de 5,5°C), o que poderia ocasionar danos irreversíveis ao tecido pulpar, ao tecido periodontal e aos tecidos adjacentes (GERALDO-MARTINS et al., 2005; OELGIESSER; BLASBALG; BEM-AMAR, 2003; PAGHDIWALA; VAIDYANATHAN; PAGHDIWALA, 1993; ZACH; COHEN, 1965;).

Devido à grande interação do laser de Er:YAG (2,94 μm) com a água e a hidroxiapatita (BACHMANN; ZECELL, 2005; HIBST; KELLER, 1989), ocorre rápido

aquecimento superficial do tecido irradiado, reduzindo sua penetração em profundidade e, conseqüentemente diminuindo o risco de aumento de temperatura a níveis críticos nas camadas mais profundas (KELLER; HIBST, 1989; PAGHDIWALA; VAIDYANATHAN; PAGHDIWALA, 1993).

Devido a estas considerações, apesar de não ter sido realizada a avaliação prévia da temperatura pulpar com os parâmetros analisados neste estudo, acreditamos que, o uso do laser de Er:YAG no modo desfocado, 3 ou 6 mm, está dentro de parâmetros considerados seguros para o tecido pulpar e periodontal e para o remanescente dental.

Estudo prévio mostrou que a irradiação acima de 10 J/cm², promoveu elevação na temperatura pulpar acima do limiar de segurança (THEODORO et al., 2003). Com a irradiação do laser de Er:YAG no modo focado, maior densidade de energia foi aplicada, ao redor de 18 J/cm², além do risco de danos à polpa, ablação superficial do esmalte foi um achado contraindicando seu uso clínico sobre a lesão de mancha branca (Fig. 5.2).

No que diz respeito à refrigeração, como a ponta de prevenção 50/10, utilizada com o laser de Er:YAG, não apresenta saída de água, e com base na literatura consultada, optou-se pela utilização de refrigeração apenas com ar da seringa tríplice associado à sucção com bomba à vácuo para tentar diminuir o aumento brusco da temperatura e a possível inalação de tecido que poderia ser ablasionado (HOSSAIN et al., 2000). Apesar do resfriamento com spray de água estar relacionado à menor elevação da temperatura pulpar, maior eficiência na ablação no esmalte hígido é obtida.

Portanto, levando em consideração o risco da ablação, o possível benefício da prevenção de cárie com o laser seria prejudicado (BURKES et al., 1992; HOSSAIN et al., 2000; LIU; LIU; STEPHEN, 2006; PAGHDIWALA; VAIDYANATHAN; PAGHDIWALA, 1993). Outro fator negativo para a indicação do uso de spray de água seria a necessidade de aplicação de uma energia mais alta para que a prevenção de cárie fosse induzida, e isto acarretaria no aumento dos danos aos tecidos dentários periféricos (LIU; LIU; STEPHEN, 2006).

Estudos mais recentes também têm se preocupado com a determinação de parâmetros subablasivos do laser de Er:YAG, ou seja, parâmetros que não promovam alterações morfológicas macroscópicas visíveis - ablação ou fusão (melting) da superfície irradiada - mas que sejam capazes de induzir alterações na composição química ou estrutural no tecido alvo (esmalte), de modo a torná-lo mais resistente frente a um desafio ácido (APEL et al., 2002a; APEL et al., 2004; APEL et al., 2005; BEVILACQUA, 2002; DELBEM et al., 2003; FREITAS, 2005).

Foi ressaltado ainda que, conforme o parâmetro utilizado, diferentes padrões superficiais do tecido alvo poderiam ser observados, e que a avaliação morfológica e ultra-estrutural da área irradiada complementariam os estudos que avaliam a resistência ácida do esmalte irradiado (BEVILACQUA, 2002; CECCHINI, 2001; HAIDER; WHITE; RICH, 1999; MORIOKA; TAGOMORI; OHO, 1991).

O limiar de ablação do laser de Er:YAG, determinado sobre o esmalte hígido, se encontra ao redor de 7-11 J/cm² com 5 Hz (APEL et al., 2002b; FRIED et al., 1996; LI; CODE; De MERWE, 1992) e 18,6 J/cm² com 2 Hz (LI;

CODE; De MERWE, 1992). Entretanto, mesmo com a aplicação de uma densidade de energia menor, 6 J/cm^2 , alterações que não eram percebidas durante a inspeção visual macroscópica, foram visualizadas no microscópio de varredura confocal a laser, o que segundo estes autores contra-indicaria seu uso clínico principalmente quando utilizado sobre o esmalte dental hígido (APEL et al., 2005).

Devemos ter em mente que estes estudos sobre efetividade e morfologia sempre foram conduzidos sobre o esmalte hígido, e a utilização destes parâmetros deve ser analisada com cuidado durante a elaboração de novas pesquisas principalmente quando a metodologia incluir diferentes tipos de substrato e tecido alvo. Estudo prévio da literatura mostrou que, ao comparar o grau de ablação após irradiação do laser de Er:YAG, sobre o esmalte hígido e cariado, um aumento da profundidade das crateras ocorreu quando a lesão de cárie estava presente (HIBST; KELLER, 1989). Resultados do estudo preliminar desenvolvido nesta pesquisa, que utilizou lesões incipientes de cárie, confirmam este fato (Fig. 4.2).

A partir da análise dos parâmetros obtidos por estudos prévios, onde o laser foi irradiado sobre o esmalte hígido, e visto que não haviam sido estabelecidos previamente parâmetros que pudessem ser empregados sobre lesões de mancha branca sem que danos irreversíveis à superfície dentária fossem observados, percebeu-se a necessidade de testar novos parâmetros a partir dos dados obtidos sobre o esmalte hígido.

As imagens da figura 4.2, obtidas com lupa estereoscópica, ilustram a fase preliminar deste estudo, onde se pode observar que todos os parâmetros testados, que haviam sido propostos para irradiação sobre o esmalte hígido, promoveram ablação quando irradiados sobre o esmalte desmineralizado. A partir da análise destas imagens, modificações na metodologia inicial foram necessárias.

Inicialmente optou-se pela modificação do período de desenvolvimento das lesões incipientes de cárie (baseline), prévio à irradiação. A duração da ciclagem de pH sofreu redução, de 14 para 7 dias, pois além da observação de perda de integridade superficial (pequenas cavitações) em poucos espécimes quando o período de ciclo maior foi utilizado, havia ainda a preocupação do comportamento da superfície desmineralizada após os tratamentos experimentais seguido de novo período de ciclagem de pH de 14 dias.

Outra modificação do projeto original esteve relacionada aos parâmetros aplicados. Devido à desmineralização superficial presente nos espécimes testados, a irradiação com densidades de energia consideradas ótimas para o dente hígido promoveu grande perda estrutural na lesão de mancha branca (Fig. 4.2). Como o equipamento de laser de Er:YAG utilizado nesta pesquisa não permitia ajuste de energias menores que 60 mJ e, como a aplicação deste parâmetro sobre a lesão de mancha branca promoveu grandes danos superficiais (ablação / perda estrutural), um recurso utilizado foi o aumento na distância focal, consequentemente aumento da área de

irradiação, para diminuir a densidade de energia aplicada sobre o tecido alvo visto que a densidade de energia e a área irradiada são inversamente proporcionais. A partir destas considerações e como a distância focal de 1 mm, comparado à irradiação do laser no modo focado, pareceu não influenciar nas características morfológicas do esmalte irradiado, distâncias de 3 e 6 mm foram também testadas, pois não foi possível identificar alterações morfológicas macroscópicas visíveis após sua aplicação (Fig. 5.3a e 5.4a). Deste modo densidades de 3,23 e 1,04 J/cm², respectivamente com irradiação desfocada 3 mm e 6 mm, puderam ser testadas e, após observação com lupa estereoscópica e MEV, foi possível comprovar a ausência de alteração morfológica no esmalte desmineralizado irradiado com estes parâmetros (Fig. 5.3 e 5.4).

Neste estudo, a variação na densidade de energia obtida entre a irradiação do laser de érbio no modo focado e desfocado 3 mm foi grande, com densidade de energia respectiva de 18,67 e 3,23 J/cm², não sendo possível a determinação exata do limiar de ablação. Decorrente destes achados seria interessante que futuras pesquisas determinassem o limiar de ablação do tecido desmineralizado (mancha branca), de modo que se obtenha o máximo de efeito terapêutico/preventivo, sem alterações irreversíveis e indesejadas, tanto para o tecido alvo quanto para as superfícies adjacentes, e sem efeitos nocivos, à superfície do esmalte, após o tratamento.

Alguns autores relataram ainda, que o aumento da resistência ácida estaria diretamente relacionado com o aumento da densidade de energia

irradiada no esmalte hígido (TAGOMORI; MORIOKA, 1989), porém como foi observado anteriormente, este tipo de recurso não poderia ser empregado quando se trabalha com esmalte desmineralizado, pois mesmo que densidades de energia superiores mostrassem que a paralisação da lesão de cárie poderia ocorrer, ablação superficial foi uma complicação indesejada e as imagens do estudo preliminar deste trabalho confirmam esta afirmação (Fig. 4.2).

A irradiação do laser de Er:YAG, no modo focado ($18,67 \text{ J/cm}^2$), tanto na observação com lupa estereoscópica quanto na MEV, mostrou uma superfície altamente irregular com presença de áreas de ablação (Fig. 5.2a, 5.2b, 5.2c e 5.2d). Assim como em estudos anteriores (BEVILACQUA, 2002; CECCHINI, 2001; HAIDER; WHITE; RICH, 1999), um padrão homogêneo de irradiação não foi encontrado em nenhum espécime avaliado neste grupo, ou seja, foi possível distinguir as áreas irradiadas, onde se observava spots bem definidos com diferentes graus de profundidade de ablação e áreas não irradiadas (Fig. 5.2c e 5.2d). Portanto, apesar da associação do laser no modo focado e flúor ter sido efetiva na paralisação da lesão de cárie e no aumento da resistência à desmineralização ácida, sua utilização na clínica se tornaria inviável devido aos danos superficiais irreversíveis ocasionados.

Com relação aos parâmetros testados com laser de Er:YAG no modo desfocado, apesar do benefício do aumento da resistência ácida no esmalte desmineralizado, estudos com lasers ainda não foram desenvolvidos para confirmar se esta superfície irradiada estaria propícia à maior adesão microbiana ou ao maior acúmulo de biofilme bacteriano como questionado

por estudos prévios (CECCHINI, 2001; FREITAS, 2005). Assim futuros estudos para determinar a adesão bacteriana sobre a superfície irradiada também devem ser realizados para que seus resultados possam complementar o presente trabalho.

Diferente dos resultados favoráveis obtidos com a aplicação do laser para prevenção da formação de novas lesões de cárie (DELBEM et al., 2003; HOSSAIN et al., 2000; MORIOKA; TAGOMORI; OHO, 1991; WATANABE et al., 1998), alguns estudos mostraram apenas uma tendência de efeito protetor dos lasers de Er:YAG e Er:YSGG quando irradiados sobre o esmalte hígido, tanto nos estudos que avaliaram a solubilidade do cálcio quanto na avaliação *in situ* (APEL et al., 2002a; APEL et al., 2004).

Alguns autores relataram ainda que densidades de energias mais baixas, entre 4 a 8 J/cm², também não foram efetivas quando comparados com o esmalte hígido (APEL et al., 2002a; APEL et al., 2004). Entretanto, quando parâmetros subablasivos menores foram utilizados no presente estudo, entre 1,04 e 3,23 J/cm², foi possível observar um efeito preventivo significativo mesmo sobre lesões de mancha branca.

No presente estudo observamos que, em comparação com o controle positivo, a irradiação isolada com laser de Er:YAG desfocado, com distâncias de 6 e 3 mm, promoveu redução na profundidade do corpo da lesão, respectivamente, de 18 e 23%. Estes resultados corroboram com a literatura que mostrou redução ao redor de 34% a 44%, na profundidade da lesão com o uso isolado do laser de argônio (FLAITZ et al., 1995; WESTERMAN et al., 2002).

Estudo prévio, citou um possível sinergismo na associação do érbio com o flúor, com conseqüente diminuição da perda mineral superficial, quando comparado com o uso isolado do flúor (DELBEM et al., 2003). Assim como demais trabalhos na literatura (ANDERSON et al., 2000; DELBEM et al., 2003; FEATHERSTONE et al., 1998; FLAITZ et al., 1995; TAGOMORI; MORIOKA, 1989), neste estudo resultados melhores, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) também foram obtidos com a associação do Er:YAG com o flúor nos grupos LCF e L6F em comparação, respectivamente, com os grupos LC e L6 (Fig 5.6). Exceção ocorreu no trabalho que relatou que a associação entre o laser e a aplicação tópica de flúor promoveu aumento na solubilidade após a irradiação adicional do laser, porém neste caso, o flúor foi aplicado antes do laser (APEL et al., 2002a).

Embora alguns autores acreditem numa ação anti-cariogênica apenas superficial (DELBEM et al., 2003), promovendo paralisação da lesão de cárie e não sua remineralização, como observado neste estudo, nos grupos laser Er:YAG focado associado ao flúor, laser Er:YAG desfocado 6 mm associado ao flúor, laser Er:YAG desfocado 3 mm associado ou não ao flúor (Fig. 5.6), este trabalho também mostrou que ocorreu redução da progressão da profundidade da cárie com resultados similares aos observados com os lasers de CO₂, argônio e Nd:YAG, ou seja, o laser influenciou a formação das lesões de cárie sub-superficiais (ANDERSON et al., 2000; FLAITZ et al., 1995).

Variação considerável na porcentagem de redução da profundidade da lesão de cárie foi observada quando a associação entre o laser e o flúor

estava presente. Os valores variaram entre 27% a 50% sendo dependentes dos parâmetros empregados nos diversos estudos (FLAITS et al., 1995; FRIED et al., 1996; LIU; LIU; STEPHEN, 2006; YOUNG; FRIED; FEATHERSTONE, 2000). Os dados observados no presente estudo mostraram redução na profundidade da lesão de cárie ao redor de 39% quando o laser de Er:YAG desfocado 6 mm foi associado à aplicação tópica de flúor.

Várias explicações poderiam ser sugeridas para explicar a efetividade deste parâmetro, laser Er:YAG desfocado a 6 mm associado à aplicação do gel fluoretado, na redução do corpo das lesões de cárie. O aumento da resistência ácida e do efeito anti-cariogênico poderia ser decorrente da maior formação de fluoreto de cálcio após a aplicação do laser devido à possível modificação na superfície da lesão de cárie, assim como ocorre maior formação de fluoreto de cálcio em lesões de mancha branca do que sobre o esmalte hígido (BRUUN; GIVSKOV 1991; DELBEM et al., 2003; LEME et al., 2003). Além disso, é possível que devido à maior reatividade deste tecido, o laser poderia aumentar mais ainda a irregularidade superficial, permitindo que o flúor apresentasse maior interação com esta superfície alterada (FLAITS et al., 1995).

O esmalte alterado pela associação poderia permitir a reprecipitação ou “aprisionamento” de íons cálcio, fosfato e fluoreto liberados durante a formação da lesão de cárie promovendo certo grau de proteção contra o desafio cariogênico (FLAITS et al., 1995; HICKS et al., 2003; MORIOKA; TAGOMORI; OHO, 1991).

Alguns autores acreditam que após a irradiação do laser sobre a superfície do esmalte ocorre formação de microporosidades que são decorrentes da perda de compostos orgânicos, água, e carbonato. Estas microporosidades criadas pela irradiação do laser poderiam facilitar a captura dos íons cálcio, fosfato e flúor liberados, que agiriam como sítios de reprecipitação mineral durante o desafio cariogênico (FEATHERSTONE; FRIED; DUHN, 1998; OHO; MORIOKA, 1990). No entanto, nas imagens obtidas em MEV, não foi observado grandes diferenças morfológicas superficiais entre o grupo L6 e o grupo C, exceção de ligeira irregularidade superficial presente no primeiro grupo (respectivamente fig. 5.4f e 5.1f). No grupo L3 a imagem da figura 5.3f sugere ligeiro aumento da porosidade, porém esta característica não foi constante em todos os espécimes deste grupo.

Assim como a deposição do fluoreto de cálcio varia conforme a condição superficial do esmalte, ou seja, em comparação com o esmalte sadio há maior deposição de fluoreto de cálcio no esmalte com lesão de cárie (BRUUN; GIVSKOV 1991), a irradiação com o laser de Er:YAG poderia ter tornado o esmalte desmineralizado mais reativo à aplicação e interação com o flúor.

Outra possível explicação seria uma alteração morfológica na zona superficial da lesão de cárie, permitindo maior permeabilidade aos íons cálcio e fosfato com conseqüente diminuição efetiva do corpo da lesão. Estudos mostraram que a utilização de produtos fluoretados de alta concentração, como o flúor gel fosfato acidulado ou o verniz fluoretado,

dificultariam a entrada de íons para o corpo da lesão (LEME et al., 2003; MAIA; de SOUZA; CURY, 2003). A alta concentração de flúor permitiria uma mineralização rápida da zona superficial, fazendo com que a lesão se tornasse paralisada, mas dificultaria a remineralização do corpo da lesão. No presente trabalho o laser de Er:YAG, ao contrário, poderia ter alargado essas vias de difusão, reduzindo a profundidade da lesão e possibilitando um efeito sinérgico entre o laser e o flúor. No entanto, se realmente essa alteração morfológica ocorreu, não foi possível de ser detectada nas fotomicrografias da MEV.

Alterações da composição química do esmalte (e não morfológica), decorrente do efeito térmico após a irradiação dos lasers no tecido alvo como foi sugerido previamente por outros autores (DELBEM et al., 2003; FLAITZ et al., 1995; FOWLER; KURODA, 1986; FRIED et al., 1996), poderia ser um outro mecanismo que explicaria os resultados favoráveis obtidos pelo grupo L6F. Alguns autores acreditam que a irradiação do esmalte, com determinados parâmetros, acarretaria no aumento da densidade do esmalte decorrente dos efeitos térmicos de fusão e ressolidificação tecidual (HOSSAIN et al., 2001; MORIOKA; TAGOMORI; OHO, 1991), porém para que a fusão da superfície irradiada tivesse ocorrido seriam necessárias energias maiores do que as utilizadas no presente estudo. Com estas densidades de energia baixas só é possível promover aquecimento da água, produção de vapor e pressão no interior do esmalte sem que ressolidificação ou fusão da estrutura do cristal do esmalte seja observada (DELBEM et al., 2003).

Alguns autores sugerem que o aquecimento da superfície do esmalte, induzido pelo laser, poderia modificar a estrutura cristalina do esmalte, pois foi observado que temperaturas entre 300-400°C diminuiriam a solubilidade do esmalte com conseqüente redução da profundidade da lesão devido à perda de carbonato e água (FOWLER; KURODA, 1986; FLAITZ et al., 1995; OHO; MORIOKA, 1990). Temperaturas acima de 320°C seriam alcançadas com densidades de energia maiores que 7 J/cm², acima do limiar de ablação (FRIED et al., 1996). Este mecanismo poderia explicar o resultado favorável na paralisação da lesão de cárie encontrado no grupo laser no modo focado associado ao flúor. Porém como comentado anteriormente, a ablação resultante deste parâmetro inviabilizaria sua utilização clínica.

Como pode ser observado, o mecanismo responsável pelo aumento da resistência ácida do esmalte hígido após irradiação com diferentes comprimentos de onda do laser não está totalmente esclarecido. Várias hipóteses foram sugeridas, porém não existe consenso sobre este assunto. Como o comportamento da lesão de cárie incipiente irradiada com laser de Er:YAG e o mecanismo responsável pela paralisação destas lesões ainda não foram explorados, futuros estudos devem ser realizados para que o entendimento deste mecanismo seja alcançado e, conseqüentemente, sua indicação como coadjuvante no tratamento de lesões de cárie ocorra de maneira eficiente e segura.

A longevidade dos efeitos da radiação do laser e a necessidade de controles após o tratamento com laser de alta potência têm sido questionadas pela literatura. Ainda não foi determinada a durabilidade do

tratamento para que se possa estabelecer prazos para o retorno do paciente, para consultas de controle e manutenção. Nesse sentido, novos estudos *in vivo* devem ser propostos para avaliar a duração deste efeito preventivo (FREITAS, 2005).

O resultado deste estudo mostrou que o laser de Er:YAG, de alta potência, pode ser um coadjuvante no controle da doença cárie. Porém, outros estudos *in vitro* para buscar novos parâmetros, que possam ser aplicados sobre lesões de mancha branca, e para analisar a adesão microbiana nesta superfície modificada por laser, e estudos *in situ*, devem ser realizados para confirmar os resultados obtidos com este estudo. Só então será possível a realização de estudos clínicos para viabilizar a aplicação do laser de Er:YAG na paralisação e remineralização de lesões incipientes de cárie, sem promover prejuízos irreversíveis na superfície irradiada.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

1. A observação das superfícies tratadas mostraram que a irradiação com laser de Er:YAG no modo focado, 60 mJ; 2 Hz; 18,67 J/cm², sobre a lesão de mancha branca artificial no esmalte decíduo, produziu ablação superficial. Além disso, a irradiação não ocorreu de maneira uniforme sendo possível distinguir áreas irradiadas e não irradiadas.

A observação dos espécimes dos grupos laser de Er:YAG no modo desfocado, com distância de 3mm (60 mJ; 2 Hz; 3,23 J/cm²) e de 6mm (60 mJ; 2 Hz; 1,04 J/cm²) sugerem ausência de alteração superficial.

2. Assim como o uso isolado do flúor, a associação entre a irradiação com laser de Er:YAG e o flúor foi capaz de impedir a progressão da lesão de cárie, nos grupos laser no modo focado associado com o flúor, laser desfocado, com distância de 3 mm e 6 mm, associado ao flúor. Porém apenas a irradiação com laser de Er:YAG desfocado com distância de 6 mm associado ao flúor foi capaz de promover a redução da profundidade das lesões incipientes de cárie artificiais em dentes decíduos humanos.

REFERÊNCIAS¹

Anderson JR, Ellis RW, Blankenau RJ, Beiraghi SM, Westerman GH. Caries resistance in enamel by laser irradiation and topical fluoride treatment. *J Clin Laser Med Surg* 2000;18:33-6.

Apel C, Birker L, Meister J, Weiss C, Gutknecht N. The caries-preventive potential of subablative Er:YAG and Er:YSGG laser irradiation in an intraoral model: a pilot study. *Photomed Laser Surg* 2004;22:312-7.

Apel C, Meister J, Götz H, Duschner H, Gutknecht N. Structural changes in human dental enamel after subablative erbium laser irradiation and its potential use for caries prevention. *Caries Res* 2005;39:65-70.

Apel C, Meister J, Schmitt N, Gräber HG, Gutknecht N. Calcium solubility of dental enamel following sub-ablative Er:YAG and Er:YSGG laser irradiation in vitro. *Laser Surg Med* 2002a;30:337-41.

Apel C, Meister J, Ioana RS, Franzen R, Hering P, Gutknecht N. The ablation threshold of Er:YAG and Er:YSGG laser radiation in dental enamel. *Lasers Med Sci* 2002b;17:246-52.

Argenta RMO, Tabchoury COM, Cury JA. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17:241-6.

Bachmann L, Zezell DM. Estrutura e composição do esmalte e dentina. São Paulo: Livraria da Física; 2005.

Backer-Dirks O. Postruptive changes in dental enamel. *J Dent Res* 1966;45:503-11.

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

Bahar A, Tagomori S. The effect of normal pulsed Nd:YAG laser irradiation on pits and fissures in human teeth. *Caries Res* 1994;28:406-7.

Bevilacqua FM. Estudo *in vitro* da incorporação de flúor e resistência ácida do esmalte dental irradiado com laser de Er:YAG: análise de espectrometria de absorção atômica e espectrofotometria [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2002.

Boari HGD, Zezell DM, Eduardo CP. Dye-enhancing Nd:YAG irradiation of enamel aiming caries prevention. *J Dent Res* 1999;79:1079.

Burkes Jr EJ, Hoke J, Gomes E, Wolbarsht M. Wet and dry enamel ablation by Er:YAG laser. *J Prosthet Dent* 1992;67:847-51.

Bruun C, Givskov H. Formation of CaF₂ on sound enamel and in caries-like enamel lesions after different forms of fluoride applications *in vitro*. *Caries Res* 1991;25:96-100.

Cecchini RCM. Estudo *in vitro* do efeito da radiação do laser de Er:YAG em esmalte dental: análise de espectrometria de emissão atômica e microscopia eletrônica de varredura [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2001.

Clarkson BH, Rafter ME. Emerging methods used in the prevention and repair of carious tissues. *J Dent Educ* 2001;65:1114-20.

Coluzzi DJ. An overview of laser wavelengths used in dentistry. *Dent Clin North Am* 2000;4:753-65.

Cozean C, Arcoria CJ, Pelagalli J, Powell GL. Dentistry for the 21st century? *J Am Dent Assoc* 1997;128:1080-7.

Delbem ACB, Cury JA, Nakassima CK, Gouveia VG, Theodoro LH. Effect of Er:YAG laser on CaF₂ formation and its anti-cariogenic action on human enamel: an *in vitro* study. *J Clin Laser Med Surg* 2003;21:197-201.

Ebel P. Estudo *in vitro* do efeito do laser de diodo sobre a superfície de esmalte dental humano desmineralizado artificialmente [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2003.

Eduardo CP, Gouw-Soares S, Haypek P. Utilização clínica dos lasers. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. Dentística/Laser. São Paulo: Artes Médicas. p. 441-61. 2002.

Featherstone JDB. Modeling the caries – inhibitory effects of dental materials. Dent Mat 1996;12:194-7.

Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries? Role of low level fluoride. Community Dent Oral Epidemiol 1999;27:31-40.

Featherstone JDB, Fried D, Duhn C. Surface dissolution kinetics of dental hard tissue irradiated over a fluence range of 1-8 J/cm². Proc SPIE 1998;3248:146-51

Featherstone JDB, Barrett-Vespone NA, Fried D, Kantorowitz Z, Seka W. CO₂ laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. J Dent Res 1998;77:1397-403.

Flaitz CM, Hicks MJ, Westerman GH, Berg JH, Blankenau RJ, Powell GL. Argon laser irradiation and acidulated phosphate fluoride treatment in caries-like lesion formation in enamel: an *in vitro* study. Pediatr Dent 1995;17(1):31-5.

Fowler BO, Kuroda S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. Calcif Tissue Int 1986; 38:197-208.

Freitas PM. Estudo *in vitro* do efeito da irradiação com o Laser de Er,Cr:YSGG na inibição do processo de desmineralização do esmalte dental [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

Frentzen M, Koort HJ. Histological investigation of mid infrared laser ablation of dental hard tissues. In: Proceedings of the 3rd. International Congress on Lasers in Dentistry;1992; Utah. p.243-244.

Fried D, Featherstone JDB, Visuri SR, Seka W, Walsh JT. The caries inhibition potential of Er:YAG and Er:YSGG laser radiation. *Proc SPIE* 1996;2672:73-8.

Geraldo-Martins VR, Tanji EY, Wetter NU, Nogueira RD, Eduardo CP. Intrapulpal temperature during preparation with the Er:YAG laser: an *in vitro* study. *Photomed Laser Surg* 2005;23:182-6.

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 Surg Med* 1999;25:401-06.

Gutkneck N, Eduardo CP. A odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica. Trad. de Hildegard T. Buckup. São Paulo: Quintessence; 2004.

Haider SM, White GE, Rich A. Combined effects of argon laser irradiation and fluoride treatments in prevention of caries-like lesion formation in enamel: an *in vitro* study. *J Clin Pediatr Dent* 1999;23:247-57.

Hibst R, Keller U. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: I. Measurement of the ablation rate. *Lasers Surg Med* 1989;9:338-44.

Hicks MJ, Flaitz CM, Ellis R, Westerman G, Powell L. Primary tooth enamel surface topography with *in vitro* argon laser irradiation alone and combined fluoride and argon laser treatment: scanning electron microscopic study. *Pediatr Dent* 2003;25:491-6.

Hicks MJ, Winn II D, Flaitz C, Powell L. *In vivo* caries formation in enamel following argon laser irradiation and combined fluoride and argon laser treatment: a clinical pilot study. *Quintessence Int* 2004;35:15-20.

Holmen L, Ogaard B, Rolla G, Thylstrup A. A polarized and scanning electron microscope study of the effect of Duraphat treatment on *in vivo* caries. *Scand J Dent Res* 1986;94:521-9

Hossain M, Nakamura Y, Kimura Y, Yamada Y, Ito M, Matsumoto K. Caries-Preventive effect of Er:YAG laser irradiation with or without water mist. J Clin Laser Med Surg 2000;18:61-5.

Hossain M, Nakamura Y, Kimura Y, Yamada Y, Kawanaka T, Matsumoto K. Effect of pulsed Nd:YAG laser irradiation on acid demineralization of enamel and dentin. J Clin Laser Med Surg 2001;19:105-8.

Hsu C. A pilot study investigating the potencial effects of an Er:YAG laser irradiation on the prevention of enamel demineralization. In: Proceedings of 7th International Congress on Lasers in Dentistry; 2000; Belgica. p.21.

Hsu CYS, Jordan TH, Dederich DN, Wefel JS. Laser-matrix-fluoride effects on enamel demineralization. J Dent Res 2001;80:1797-801.

Issa AI, Preston KP, Preston AJ, Toumba KJ, Duggal MS. A study investigation the formation of artificial sub-surface enamel caries-like lesions in deciduous and permanent teeth in the presence and absence of fluoride. Arch Oral Biol 2003;48:567-71.

Itthagarun A, Wei SHY. The effect of different commercial dentifrices on enamel lesion progression: an *in vitro* ph-cycling study. Int Dent J 2000;50:21-8.

Kato IT. Estudo *in vitro* dos efeitos promovidos pelo Laser de Diodo em 960 nm no esmalte dental humano: análise de temperatura, análise morfológica e avaliação da resistência à desmineralização [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2004.

Kawasaki K, Tanaka Y, Takagi O. Crystallographic analysis of demineralized human enamel treated by laser-irradiation or remineralization. Arch Oral Biology 2000;45:797-804.

Keller U, Hibst R. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: II. Light microscopic and SEM investigations. Lasers Surg Med 1989;9:345-51.

Kimura Y, Wilder-Smith P, Arrastia-Jitosho AMA, Liaw LHL, Matsumoto K, Berns MW. Effects of nanosecond pulsed Nd: YAG laser irradiation on dentin resistance to artificial caries-like lesion. *Laser Surg Med* 1997;20:15-21.

Klein ALL, Rodrigues LKA, Eduardo CP, Santos MN, Cury JA. Caries inhibition around composite restorations by pulsed carbon dioxide laser application. *Eur J Oral Sci* 2005;113:239-44.

Leme AFP, Tabchoury CPM, Zero AT, Cury JA. Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. *Am J Dent* 2003;16:91-5.

Li ZZ, Code JE, De Merwe WPV. Er:YAG laser ablation of enamel and dentin of human teeth: determination of ablation rates at various fluences and pulse repetition rates. *Lasers Surg Med* 1992;12:625-30.

Liu J-f, Liu Y, Stephen HC-Y. Optimal Er:YAG laser energy for preventing enamel demineralization. *J Dent* 2006;34:62-6.

Maia LC, de Souza IPR, Cury JA. Effect of a combination of fluoride dentifrice and varnish on enamel surface rehardening and fluoride uptake in vitro. *Eur J Oral Sci* 2003;111:68-72.

Mendes FM, Nicolau J. Utilization of laser fluorescence to monitor caries lesions development in primary teeth. *J Dent Child* 2004;71:139-42.

Morioka T, Tagomori S. Applicability of Nd:YAG laser on prevention of dental caries. *Proc SPIE*; 1988:907:94-5.

Morioka T, Tagomori S, Oho T. Acid resistance of human enamel with Erbium:YAG laser. *J Clin Laser Med Surg* 1991;215-7.

Myaki SI, Watanabe I, Eduardo CP, Issao M. Nd:YAG laser effects on the occlusal surface of premolars. *Am J Dent* 1998;11:103-5.

Navarro RS. Resistência à tração de resina composta sobre esmalte e dentina condicionados com laser de Er:YAG e um sistema adesivo auto-

condicionante. Análise das superfícies pela microscopia eletrônica de varredura [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2002.

Oelgiesser D, Blasbalg J, Ben-Amar A. Cavity preparation by Er-YAG laser on pulpal temperature rise. *Am J Dent* 2003;16:96-8.

Oho T, Morioka T. A possible mechanism of acquired acid resistance of human dental enamel by laser irradiation. *Caries Res* 1990;24:86-92.

Oliveira MV, Quinto Jr. J, Rattichieri F, Zezell DM, Eduardo CP, Wetter NU. Morphological and thermal analysis of resolidied dental enamel surface after dye-assisted irradiation with a 960-nm diode laser. *J Oral Laser Applic* 2001;1:201-6.

Paghdwala AF, Vaidyanathan TK, Paghdwala MF. Evaluation of erbium:yag laser radiation of hard dental tissues: analysis of temperature changes, depth of cuts and structural effects. *Scanning Microsc* 1993;7:989-97.

Parkins FM, Miller RL, Furnish GM, O'Toole TJ. YAG laser treatment in pediatric dentistry. *J Calif Dent Assoc* 1991;19:43-50.

Pearson GJ, Schuckert KHS. The role of lasers in dentistry: present and future. *Dent Update* 2003;30:70-6.

Pelino JEP, Mello JB, Eduardo CP, Jorge AOC. *In vitro* study of the Nd:YAG laser effect on human electron microscope analysis. *J Clin Laser Med Surg* 1999;17(4):171-7.

Rodrigues LKA, Santos MN, Pereira D, Assaf AV, Pardi V. Carbon dioxide laser in dental caries prevention. *J Dent* 2004;32:531-40.

Sakakibara Y, Ishimaru K, Asano S, Takamizu M, Gotoh S, Kohno A. Morphological change of tooth surface irradiated by Er:YAG. In: 4th International Congress on Lasers in Dentistry; 1994; Bologna. p.163-6.

Santaella MRLA, Braun A, Matson E, Frentzen M. Effect of diode laser and fluoride varnish on initial surface demineralization of primary dentition enamel: an *in vitro* study. *Int J Paediat Dent* 2004;14:199-203.

Schwarz F, Sculean A, Berakdar M, Szathmari L, Georg T, Becker J. *In vivo* and *in vitro* effects of an Er:YAG laser, a GaAlAs diode laser, and scaling and root planning on periodontally diseased root surfaces: a comparative histology study. *Lasers Surg Med* 2003;32:359-66.

Stabholz A, Zeltser R, Sela M, Peretz B, Moshonov J, Ziskind D, et al. The use of lasers in dentistry: principles of operation and clinical applications. *Compendium* 2003;24:935-48.

Tagomori S, Morioka T. Combined effects of laser and fluoride on acid resistance of human dental enamel. *Caries Res* 1989;23:225-31.

Tagomori S, Inai Y, Numata Y, Morioka T. The effect of laser irradiation on remineralization of artificial enamel lesion. In: *Proceedings of the 3rd World Congress on Preventive Dentistry*;1991. p.132-4.

ten Cate JM, Duijsters PPE. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 1982;16:201-10.

ten Cate JM. Fluorides in caries prevention and control? Empiricism or science. *Caries Res* 2004;38:254-7.

Theodoro LH, Haypek P, Bachmann L, Garcia VG, Sampaio JEC, Zezell DM, et al. Effect of Er:YAG and diode laser irradiation on root surface: morphological and thermal analysis. *J Periodontol* 2003;74:838-43.

Tsai CL, Lin YT, Huang ST, Chang HW. *In vitro* acid resistance of CO₂ and Nd:YAG laser-treated human tooth enamel. *Caries Res* 2002;36:423-9.

Watanabe H, Yamamoto H, Kawamura M, Okagamv Y, Kataoka K, Ishikawa I. Acid resistance of the human teeth enamel irradiated by Er:YAG laser. In: *6th International Congress on Lasers in Dentistry*; 1998; Maui. p.68-9.

Westerman G, Flaitz C, Powell GL, Hicks J. Enamel caries initiation and progression after argon laser irradiation: *in vitro* argon laser systems comparison. J Clin Laser Med Surg 2002;20:257-62.

Wetter NU, Oliveira MV, Kito IT, Zezell DM, Eduardo CP, Viera Jr. ND. Estudo *in vitro* das alterações morfológicas do esmalte dentário irradiado com laser de diodo de alta potência: análise por microscopia eletrônica de varredura. Rev Bras Pesq Desenvolvimento 2002;4:14-9.

Wittschier M. Lasers in caries therapy: a report on clinical experience. J Oral Laser Applic 2001;1:125-32.

Young DA, Fried D, Featherstone JDB. Treating occlusal pit and fissure surfaces by IR laser irradiation. Proc SPIE; 2000;3910:247-53.

Zack L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1965;19:515-30.

APÊNDICE A – Resultados teste ANOVA complementado pelo teste LSD

Contraste	Diferença	95% CI
CP x CN	49,98	-1,40 a 101,37
CP x F	75,26	21,87 a 128,64 *
CP x L3	60,59	12,14 a 109,03 *
CP x L3F	93,70	45,26 a 142,15 *
CP x L6	47,26	-1,19 a 95,70
CP x L6F	102,99	53,22 a 152,77 *
CP x LC	2,92	-46,85 a 52,69
CP x LCF	61,09	9,71 a 112,47 *
CN x F	25,27	-30,79 a 81,34
CN x L3	10,60	-40,78 a 61,99
CN x L3F	43,72	-7,66 a 95,10
CN x L6	-2,73	-54,11 a 48,66
CN x L6F	53,01	0,38 a 105,65 *
CN x LC	-47,07	-99,70 a 5,57
CN x LCF	11,11	-43,05 a 65,27
F x L3	-14,67	-68,05 a 38,71
F x L3F	18,45	-34,93 a 71,83
F x L6	-28,00	-81,38 a 25,38
F x L6F	27,74	-26,85 a 82,33
F x LC	-72,34	-126,93 a -17,75 *
F x LCF	-14,17	-70,23 a 41,90
L3 x L3F	33,12	-15,32 a 81,56
L3 x L6	-13,33	-61,77 a 35,12
L3 x L6F	42,41	-7,36 a 92,18
L3 x LC	-57,67	-107,44 a -7,90 *
L3 x LCF	0,50	-50,88 a 51,89
L3F x L6	-46,45	-94,89 a 2,00
L3F x L6F	9,29	-40,48 a 59,06
L3F x LC	-90,79	-140,56 a -41,02 *
L3F x LCF	-32,61	-84,00 a 18,77
L6 x L6F	55,74	5,97 a 105,51 *
L6 x LC	-44,34	-94,11 a 5,43
L6 x LCF	13,83	-37,55 a 65,22
L6F x LC	-100,08	-151,14 a -49,01 *
L6F x LCF	-41,90	-94,54 a 10,73
LC x LCF	58,17	5,54 a 110,81 *

* significante (p<0,05)

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 227/04

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa *"Avaliação in vitro da capacidade de paralização de lesões incipientes de cárie produzidas artificialmente em dentes decíduos após irradiação com lasers de Er: YAG e Nd: YAG – Análise através da microscopia de luz polarizada"*, de responsabilidade da Pesquisadora **Adriana Yuri Tashima**, sob orientação do Professor Doutor **Antonio Carlos Guedes Pinto**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 06 de dezembro de 2004

Profª Drª **ROSA HELENA MIRANDA GRANDE**
Coordenadora do CEP-FOUSP