DENISE PONTES RALDI

**ESTUDO DOS EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASERS DE ALTA
POTÊNCIA E MATERIAIS DE USO ENDODÔNTICO EM
REABSORÇÕES RADICULARES EXTERNAS SIMULADAS**

São Paulo

2006

Denise Pontes Raldi

**Estudo dos efeitos da irradiação com lasers de alta potência e
materiais de uso endodôntico em reabsorções radiculares externas
simuladas**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade de São Paulo, para obter o título
de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências Odontológicas.

Área de concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques

São Paulo

2006

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Raldi, Denise Pontes

Estudo dos efeitos da irradiação com lasers de alta potência e materiais de uso endodôntico em reabsorções radiculares externas simuladas / Denise Pontes Raldi; orientador José Luiz Lage-Marques. -- São Paulo, 2006.
167p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Endodontia) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Reabsorção radicular – Laser – Avaliação 2. Endodontia

CDD 615.83
BLACK D242

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 DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

Dedico este trabalho à minha família

Aos meus queridos filhos: Pata e Digo

Mais uma vez, a “mã” pede perdão pela ausência e pelas inúmeras vezes que não lhes dei atenção. Em troca, ganhei, durante todo este período, a compreensão, o carinho e o amor de vocês.

Vocês são a razão da minha vida.

Ao meu paizinho e minha maëzinha

Por estarem sempre presentes ao meu lado, pelo carinho e pela lição de amor que me ensinaram durante toda a vida. Vocês são nosso alicerce e o foco de nossa admiração.

Aos meus irmãos e cunhados

Titina, Luciana, Polico, Chris, Olavo e André, pelo carinho, amizade e cumplicidade. Mais uma vez agradeço por todo apoio e compreensão.

A vovó Hedy

Pelo exemplo de vida e lindos momentos proporcionados por um grande presente seu.

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques, muito mais que meu orientador ou amigo, um ser humano que respeito, admiro e em quem eu realmente me espelho. Não tenho palavras para agradecer o apoio, carinho, incentivo e amizade, desde o momento que ingressei nesta casa. José Luiz, seria impossível expressar aqui todo o meu carinho e gratidão.

À querida Sueli Miyagi, agradeço pela valiosa e essencial ajuda na realização da parte experimental de cultura celular. Su, minha eterna amizade e gratidão.

À Profa. Dra. Ana Christina Claro, agradeço pela amizade, carinho, atenção e preocupação nos momentos difíceis e pela enorme ajuda dispensada durante a realização deste trabalho. Chrizinha querida, com todo carinho, muito obrigada por tudo.

Ao querido Prof. Dr. Walter Nicolli Filho, pelo ombro amigo, apoio em inúmeros momentos e pelo valioso auxílio na área de laser e na metodologia experimental. Jamais me esquecerei!

À minha amiga Bel, pela amizade verdadeira, cumplicidade em todos os momentos e grande ajuda dada, não só neste trabalho, mas durante todo o doutorado. Obrigada, “miguinha” querida.

AGRADECIMENTOS

AO Prof. Dr. Fernando Xavier, pela amizade, carinho, valiosas sugestões e, principalmente, por ter me mostrado um jeito simples de ver a vida e, principalmente, de vivê-la.

AO Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira, pela amizade e apoio desde a época em que fiz o mestrado, pelo agradável convívio e excelentes sugestões.

À Profa. Dra. Iris Maria Fróis, pela longa e maravilhosa amizade, pelo carinho, por sempre compartilhar dos meus desafios e conquistas e pelo empenho na avaliação deste trabalho.

AOS professores Drs. Robazza, Giulio, Denise Zezell, Ilíria, pela dedicação na leitura deste trabalho e por todas as sugestões.

AO querido Prof. Dr. Maximiliano Neisser, pela amizade, apoio, pelas belas fotografias tiradas e pelos incontáveis momentos de descontração.

À Profa. Dra. Márcia Martins Marques, pelo grande apoio e disponibilização do seu laboratório, possibilitando a realização dos ensaios de cultivo celular.

AO Dr. Rudimar Riva e equipe do IEAv/CTA, pela receptividade, atenção e grande colaboração na parte experimental deste estudo.

AOS professores da Disciplina de Endodontia do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, em especial ao Prof. Antoniazzi e Prof. Bombana, pela oportunidade de aprendizado, apoio e agradável convivência.

AOS meus colegas do curso de doutorado: Bel, Sueli, Adriana, Cristiane, Carmo e Alexandre, pela amizade e pelos ótimos momentos juntos.

À minha filhota querida, pelo longo tempo despendido para realização da revisão gramatical desse trabalho.

ÀS amigas Marina Beloti, Márcia Guimarães e Débora, pelo apoio, amizade e ajuda em vários momentos.

À Filó, Thelma e Gláucia, por terem cuidado tão bem da minha casa, do meu consultório, do meu filho e de mim.

À equipe do Laboratório Especial de Lasers em Odontologia - LELO – FOU SP, pela concessão do laser Er:YAG e de diodo. Em especial, à Liliane, pela gentileza e atenção, sempre que precisei.

À minha amiga Leinha, Beth e Duque, pelo grande e valioso auxílio.

À Patrícia Galdino e Lene, pela simpatia, atenção e ajuda no preparo das amostras para microscopia eletrônica.

À Ana Maria, pela atenção, afeto e ajuda durante o curso de doutorado e na realização deste trabalho.

ÀS bibliotecárias Gláucia e Vânia, pela gentileza no atendimento e pelas correções.

AOS funcionários da Pós-Graduação, especialmente à Kátia, pela simpatia e auxílio.

E a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Raldi DP. Estudo dos efeitos da irradiação com lasers de alta potência e materiais de uso endodôntico em reabsorções radiculares externas simuladas [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

Este estudo avaliou, por meio de cultivo celular e MEV, a capacidade de adesão de fibroblastos e as alterações estruturais ocorridas na superfície dentinária de reabsorções radiculares externas simuladas, após tratamento com hidróxido de cálcio, MTA e/ou radiação com laser de diodo de alta potência e laser Er:YAG. Após a hemiseção das raízes de 31 dentes unirradiculares, foram realizadas cavidades padronizadas no terço cervical de cada seção, obtendo-se 62 amostras que foram divididas em 9 grupos: grupo 1 - irradiação com laser Er:YAG (42 mJ/pulso, 10 s, 10 Hz e 38 J/cm^2); grupo 2 - irradiação com laser de diodo de alta potência (1 W, 10 s, 796 W/cm^2); grupo 3 - preenchimento da cavidade com hidróxido de cálcio e irradiação com laser Er:YAG; grupo 4 - preenchimento da cavidade com hidróxido de cálcio e irradiação com laser de diodo; grupo 5 - preenchimento da cavidade com MTA e irradiação com laser de Er:YAG; grupo 6 - preenchimento da cavidade com MTA e irradiação com laser de diodo; grupo 7 - preenchimento da cavidade com hidróxido de cálcio; grupo 8 - preenchimento da cavidade com MTA e grupo 9 (controle) - nenhum tratamento. Após a esterilização dos espécimes foi realizado o subcultivo celular com fibroblastos gengivais da linhagem FMM1, o plaqueamento dos fragmentos (5×10^4 células por fragmento) e o preparo para análise em MEV. A contagem das células aderidas evidenciou que a adesão celular foi em ordem decrescente: G1 (Er:YAG) > G2 (diodo) > G9 (controle) > G8 (MTA) > G5

(MTA+Er:YAG) > G6 (MTA+diodo) > G4 (CaOH₂+diodo) > G3 (CaOH₂+Er:YAG) > G7(CaOH₂). Observou-se diferença estatisticamente significante entre a maioria dos grupos experimentais, exceto entre os grupos: G9 x G8; G8 x G5; G8 x G4; G5 x G6; G4 x G3; G3x G7. Na análise em MEV, observou-se nas amostras irradiadas com laser Er:YAG microrugosidades na superfície dentinária, ausência de *smear layer* e túbulos dentinários abertos. As irradiadas com laser de diodo apresentaram superfície dentinária mais lisa, maior quantidade de *smear layer* e os túbulos dentinários fechados. Não foram observadas zonas de carbonização nos grupos irradiados com laser. Nos grupos nos quais se associou a radiação laser com os materiais de uso endodôntico, foram observadas zonas de derretimento e fusão nas superfícies do hidróxido de cálcio e do MTA. Diante dos resultados obtidos foi possível concluir que: a irradiação com os lasers Er:YAG e de diodo, nos parâmetros utilizados neste experimento, provocaram alterações morfológicas nas superfícies dentinárias das reabsorções simuladas que favoreceram a adesão celular; o uso do MTA nas reabsorções radiculares simuladas permitiu a adesão celular, enquanto que o hidróxido de cálcio a inibiu e a associação dos materiais de uso endodôntico com os lasers Er:YAG e de diodo resultou em alterações morfológicas na superfície do MTA, assim como, na do hidróxido de cálcio, que interferiram, de forma discreta, na adesão celular.

Palavras-Chave: laser - MTA - Reabsorção Radicular -

ABSTRACT

Raldi DP. Study of the effects of high power laser irradiation and materials for endodontic purposes on simulated external root resorptions [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

The present study, utilizing cell culture and SEM, evaluated the adhesion of fibroblasts, and the structural changes on the dentinal surface of simulated external root resorptions, after treatment with calcium hydroxide, MTA and/or high power diode laser radiation and Er:YAG laser radiation. After splitting the roots of 31 single rooted teeth, standardized cavities were done on the coronal third of each section, resulting in 62 samples which were divided into 9 experimental groups: group 1 – Er:YAG laser irradiation (42 mJ/pulse, 10 Hz, 10 s, 38 J/cm²); group 2 – high power diode laser irradiation (1 W, 10 s, 796 W/cm²); group 3 – cavity filling with calcium hydroxide and Er:YAG laser irradiation; group 4 – cavity filling with calcium hydroxide and irradiation with diode laser; group 5 – cavity filling with MTA and Er:YAG laser irradiation; group 6 - cavity filling with MTA and irradiation with diode laser; group 7 - cavity filling with calcium hydroxide; group 8 - cavity filling with MTA and group 9 (control) – not treated. After the specimens were sterilized, a subculture was done with gingival fibroblasts from cell line FMM1. The fragments were plated (5 x 10⁴ per fragment) and then prepared for SEM analyzis. The counting of adhered cells showed that the cells' adhesion was in decreasing order: G1 (Er:YAG) > G2 (diode) > G9 (control) > G8 (MTA) > G5 (MTA+Er:YAG) > G6 (MTA+diode) > G4 (CaOH₂+diode) > G3 (CaOH₂+Er:YAG) > G7(CaOH₂). Significant statistical differences were observed among most of the experimental groups, except among

the following groups: G9 x G8; G8 x G5; G8 x G4; G5 x G6; G4 x G3; G3 x G7. At the SEM analysis of the samples irradiated with Er:YAG laser, roughness on the dentinal surface, no *smear layer* and open dentinal tubules were observed. The samples irradiated with diode laser exhibited a smooth surface, more *smear layer* and closed dentinal tubules. No carbonization zones were observed at the groups irradiated with both lasers. In the groups where laser irradiation was associated with endodontic materials, melting zones and fusion on the calcium hydroxide and MTA surfaces were observed. Based on the results it may be concluded that: irradiation with Er:YAG and diode lasers, in the parameters utilized in this experiment, caused morphologic changes on the dentinal surfaces of the simulated resorptions that favored cell adhesion; the MTA used on the simulated root resorptions allowed cell adhesion while calcium hydroxide inhibited it; and, the association of the endodontic materials to Er:YAG and diode lasers resulted in morphologic changes on the MTA and on the calcium hydroxide surface, which interfered subtly with the cell adhesion.

Keywords: laser - MTA - Root Resorption

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 -	Preparo das hemisecções e demarcação das cavidades.....	86
Figura 4.2 -	Esquema representativo e dispositivo utilizado para a obtenção das cavidades simulando reabsorções radiculares externas.....	87
Figura 4.3 -	Esquema ilustrativo da obtenção dos fibroblastos para análise da adesão celular.....	91
Figura 4.4 -	Ilustração da metodologia empregada para o cálculo do número de fibroblastos plaqueados nas amostras.....	93
Figura 4.5 -	Recipiente utilizado para o plaqueamento de células nas amostras experimentais.....	95
Figura 4.6 -	Esquema da obtenção das eletromicrografias para a contagem celular.....	96
Figura 4.7 -	Programa ImageLab utilizado para a contagem das células aderidas.....	97
Figura 4.8 -	Esquema do preparo das amostras para análise em MEV.....	98
Figura 5.1 -	Desvio padrão e médias do número de fibroblastos aderidos nos diferentes grupos experimentais.....	104
Figura 5.2 -	Amostra da leitura de fibroblastos aderidos nos grupos que apresentaram maior adesão celular (G1 e G2).....	106
Figura 5.3 -	Eletromicrografia do aspecto morfológico dos fibroblastos aderidos nos grupos 1 e 2.....	107

Figura 5.4 - Eletromicrografias da amostra do grupo 1 evidenciando uma maior adesão dos fibroblastos nos locais tocados pela fibra óptica do laser Er:YAG.....	108
Figura 5.5 - Amostras da leitura de fibroblastos aderidos nos grupos que apresentaram adesão celular intermediária (G8 e G9).....	109
Figura 5.6 - Amostras da leitura do número de fibroblastos aderidos nos grupos nos quais se realizou a associação MTA com radiação laser (G5 e G6).....	110
Figura 5.7 - Amostras da leitura de fibroblastos no grupo tratado com hidróxido de cálcio (G7).....	111
Figura 5.8 - Amostras da leitura do número de fibroblastos aderidos no grupo onde se realizou a associação hidróxido de cálcio com laser Er:YAG (G3).....	112
Figura 5.9 - Amostras da leitura de fibroblastos aderidos no grupo no qual se realizou a associação hidróxido de cálcio com laser diodo (G4).....	113
Figura 5.10 - Eletromicrografias representativas do aspecto morfológico dos fibroblastos aderidos no grupo 6 (a) e no grupo controle (b).....	114
Figura 5.11 - Eletromicrografias do aspecto morfológico da superfície dentinária das amostras irradiadas com laser Er:YAG.....	117
Figura 5.12 - Eletromicrografia do aspecto morfológico da superfície dentinária das amostras irradiadas com laser de diodo.....	118
Figura 5.13 - Eletromicrografia da superfície dentinária irradiada com laser diodo com ausência (a) e com presença de <i>smear layer</i> (b).....	118
Figura 5.14 - Eletromicrografia do aspecto morfológico da superfície dentinária das amostras do grupo controle.....	119
Figura 5.15 - Eletromicrografia da superfície dentinária recoberta pelo hidróxido de cálcio.....	120

Figura 5.16 - Eletromicrografia do aspecto morfológico do hidróxido de cálcio após irradiação com laser Er:YAG - (a) aumento de 500 x e (b) aumento de 100 x	121
Figura 5.17 - Eletromicrografia do aspecto morfológico do hidróxido de cálcio após irradiação com laser diodo - (a) aumento de 500 x e (b) aumento de 100 x	121
Figura 5.18 - Eletromicrografia dos cortes longitudinais das amostras do grupo 4 (associação hidróxido de cálcio-laser diodo) - (a) aumento de 500 x e (b) aumento de 100 x	122
Figura 5.19 - Eletromicrografia do aspecto morfológico da superfície do MTA	124
Figura 5.20 - Eletromicrografia do aspecto morfológico da superfície do MTA após irradiação com laser Er:YAG.....	124
Figura 5.21 - Eletromicrografia do aspecto morfológico da superfície do MTA após irradiação com laser de diodo.....	125
Figura 5.22 - Eletromicrografia do aspecto morfológico do MTA após irradiação com laser de diodo (vista longitudinal).....	125

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ar	Argônio
AsGaAl	Arsênio- Gálio- Alumínio
cm	centímetro (unidade de medida equivalente a 10^{-2} metros)
CO ₂	dióxido de carbono
E	energia
Er:YAG	Érbio (Ítrio, Alumínio, Granada)
g	grama
h	hora
He-ne	Hélio-neônio
Ho:YAG	hólmio: ítrio-alumínio-granada
Hz	Hertz (medida de frequência de picos de ondas eletromagnéticas expressa em ciclos por segundo)
J	Joule (unidade de energia)
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado (expressa a densidade de energia e ou fluência)
kV	Kilovolts
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mg/ml	miligrama por mililitro
min	minutos

mJ	milijoule- unidade de energia (milésima parte do Joule)
mJ/cm ²	milijoule por centímetro quadrado (expressa a densidade de energia)
mJ/p	milijoule por pulso (expressa a energia em milijoule em cada pulso)
mL	mililitro (unidade equivalente a 10 ⁻³ litros)
mm	milímetro (unidade equivalente a 10 ⁻³ metros)
µm	micrômetro (unidade de medida equivalente a 10 ⁻⁶ metros)
Nd:YAG	Neodímio (Ítrio, Alumínio, Granada)
nm	nanômetro (equivalente a 10 ⁻⁹ metros - utilizado para medir comprimento de onda)
nº	número
ns	não significante
P	potência
pH	potencial hidrogeniônico
pps	número de pulsos por segundo
S	significante
s	segundos
W	Watt - unidade de potência
W/cm ²	Watt por centímetro quadrado
XeCl	Cloreto de Xenônio
°C	graus Celsius ou graus centígrados
%	por cento
<	menor

SUMÁRIO

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	29
3 PROPOSIÇÃO.....	8
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	82
4.1 Material.....	83
4.2 Metodologia experimental.....	85
5 RESULTADOS.....	100
5.1 Adesão celular.....	101
5.2 Alterações morfológicas	115
6 DISCUSSÃO.....	126
6.1 Da importância do tema.....	127
6.2 Da metodologia empregada.....	129
6.3 Dos resultados obtidos.....	133
7 CONCLUSÕES.....	145
REFERÊNCIAS.....	147
APÊNDICES.....	161
ANEXO.....	166

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A reabsorção dentária patológica é caracterizada pela atividade dentinoclástica e/ou cementoclástica, o que resulta na perda progressiva dos tecidos duros dos dentes e, quando não interrompida, compromete a sobrevivência do elemento dental.

Embora os mecanismos envolvidos na etiopatogenia destas alterações patológicas ainda não estejam esclarecidos, sabe-se que estão relacionados a aspectos da biologia celular, da inflamação, da auto-imunidade, da odontogênese e da biopatologia.

A terapia tradicionalmente proposta para dentes portadores de reabsorção radicular é o tratamento endodôntico e a utilização de pasta de hidróxido de cálcio como medicação intracanal, por períodos variáveis, em função das suas propriedades antimicrobianas e neutralizadoras do pH ácido.

No entanto, mesmo quando a terapia convencional é realizada de forma correta, os casos de insucesso ainda são significativos, principalmente aqueles decorrentes de traumatismo dental, nos quais o reimplante foi realizado tardiamente.

Assim sendo, a procura por novas substâncias ou procedimentos que possam inibir ou retardar os efeitos da reabsorção são de fundamental importância, principalmente levando-se em consideração que o traumatismo dental é o principal agente causal das reabsorções radiculares e ocorre com maior frequência em indivíduos jovens. Estudos mostram que a faixa etária mais atingida pelas avulsões dentais corresponde a crianças entre 7 a 12 anos e, nestas situações, a manutenção do elemento dental após o reimplante é essencial até que o desenvolvimento ósseo se complete e os indivíduos possam receber um tratamento reabilitador definitivo.

Trabalhos recentes comprovam que o agregado de trióxido mineral (MTA) é um bom material para selar as comunicações entre o canal e o periodonto, por promover adequado selamento quanto à infiltração de bactérias e corante, além de ser biocompatível e permitir a reparação dos tecidos periapicais e periodontais. Ademais, não é citotóxico, tampouco mutagênico, e pode ser utilizado na presença de umidade ou contaminação por sangue, sem sofrer prejuízo de suas propriedades. Pelas excelentes propriedades, o MTA tem sido indicado para o selamento de reabsorções inflamatórias externas e tem mostrado resultados promissores.

Desde a década de noventa, vários estudos têm sido realizados para analisar os efeitos dos lasers de alta potência nos tecidos dentais. Dentre os mais utilizados em Odontologia, destacam-se os lasers de CO₂ (Dióxido de Carbono), Nd:YAG (Neodímio: Ítrio-Alumínio-Granada), Er:YAG (Érbio: Ítrio-Alumínio-Granada); Ho:YAG (Holmio: Ítrio-Alumínio-Granada), Argônio e Diodos Semicondutores.

Pesquisas na área de microbiologia bucal têm comprovado a eficácia da utilização da radiação laser como coadjuvante do tratamento endodôntico e periodontal na eliminação de agentes patológicos localizados no interior dos canais radiculares e em superfícies radiculares infectadas.

Além da ação antimicrobiana, o condicionamento da superfície radicular pelos lasers de alta potência também tem sido apresentado como terapia coadjuvante do tratamento periodontal. Estudos atuais com lasers de Er:YAG e de diodo, os quais avaliaram, por meio da adesão celular, a biocompatibilidade de superfícies radiculares irradiadas, têm sugerido que tal procedimento favorece o processo de reparação de superfícies dentinárias comprometidas.

Sendo o hidróxido de cálcio a medicação de eleição para o tratamento das reabsorções radiculares externas, considerando as propriedades antimicrobianas e os efeitos estruturais provocados pela radiação laser nas superfícies radiculares e conhecendo as propriedades do MTA, parece oportuno avaliar os efeitos da radiação laser, do MTA e do hidróxido de cálcio e as possíveis interações desses materiais com a radiação laser em reabsorções radiculares simuladas.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Visando uma melhor compreensão e clareza, este capítulo abordará dois temas relevantes para a realização deste estudo, quais sejam: reabsorções radiculares e radiação laser.

2.1 Reabsorções radiculares

A reabsorção das estruturas dentárias foi descrita, inicialmente, por Michael Blum¹, em um pequeno volume ilustrado, publicado em Leipzig, no ano de 1530 apud Hopewell-Smith, 1930.

Até o presente momento, apresentam-se como um problema clínico freqüente e, com exceção da rizólise de dentes decíduos, anterior a esfoliação, considerada fisiológica, as reabsorções radiculares são sempre processos patológicos (SOARES, 2002).

Na literatura existem diferentes classificações das reabsorções, dependendo da etiologia, evolução e localização. As reabsorções podem afetar um único dente ou vários, apresentando avanço lento ou rápido e agressivo.

A reabsorção radicular externa (RRE) é um termo utilizado para designar as perdas de volume das raízes dentárias, sendo considerada seqüela de um dano ao ligamento periodontal. Pode ser decorrente de procedimentos endodônticos,

¹ Blum M. Ciência e arte da cirurgia dentária, 1530.

inflamações crônicas, movimentações ortodônticas, doenças periodontais e, principalmente, de um trauma agudo (ESBERARD; ESBERARD; ESTRELA, 2002).

Os estudos mais elucidativos referentes aos mecanismos, às causas, diagnóstico, tratamento e prognóstico das reabsorções vem sendo apresentados há apenas duas décadas (SOARES, 2002). Ainda assim, vários desses fatores não são conhecidos com exatidão, havendo diversas dúvidas sobre o tema, especialmente no que se refere ao mecanismo desse processo.

2.1.1 Classificação das reabsorções e etiologia

Na literatura estão descritos seis diferentes tipos de reabsorção radicular: superficial, inflamatória, substitutiva, traumática, sistêmica e idiopática. Na área de traumatologia dentária, segundo a localização, as reabsorções são classificadas em superficial, interna e externa e, segundo a etiologia, em inflamatória e substitutiva.

Andreasen e Hjørting-Hansen (1966a,1966b), por meio de estudo radiográfico e histológico, classificaram as reabsorções radiculares em três tipos: (i) reabsorção de superfície, que ocorre na ausência de um processo inflamatório significativo; (ii) reabsorção inflamatória, que ocorre na presença de contaminação com um tecido conjuntivo inflamado; e (iii) reabsorção por substituição e a anquilose, quando o tecido ósseo alveolar preenche o espaço deixado pelo ligamento periodontal reabsorvido ou removido e substitui o tecido dentário por tecido ósseo.

Benenati (1997), apresentou outra classificação para as reabsorções externas, denominando-as transitória e patológica, podendo, esta última, ser subdividida em inflamatória ou por substituição.

As reabsorções externas por substituição estão freqüentemente presentes nos traumatismos dentários (avulsões), quando os dentes são implantados tardiamente, ou seja, nos casos onde não foi possível a preservação da membrana periodontal. Sua etiologia parece estar relacionada com a ausência de ligamento periodontal na superfície da raiz (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Acredita-se que a origem das células que irão repovoar a área do ligamento periodontal injuriado é o que determina se a anquilose ocorrerá ou não. Esta hipótese foi reforçada pelo estudo de Line, Polson e Zander (1974). Neste estudo, após realizada injúria no ligamento periodontal das faces mesial e distal de pré-molares de macacos, foi observado que as áreas do ligamento periodontal que foram repovoadas a partir da medula óssea adjacente, anquilosaram. Entretanto, a área coronal ao ligamento periodontal injuriado foi reconstituída com tecido conjuntivo supracrestal e não anquilosou.

Segundo Andreasen e Andreasen (2001), a reabsorção por substituição pode desenvolver-se de duas maneiras diferentes: por substituição progressiva, quando a raiz é gradual e totalmente reabsorvida; ou por substituição transitória, quando uma anquilose já estabelecida desaparece posteriormente. A reabsorção progressiva parece ser induzida quando todo o ligamento periodontal é removido antes do reimplante. A raiz anquilosada torna-se, portanto, parte do sistema de remodelagem do osso normal e é gradualmente substituída por osso.

A anquilose representa uma fusão entre o osso alveolar e a superfície radicular e, segundo os autores acima mencionados, pode ser constatada cerca de duas semanas após o reimplante.

Para Consolaro (2002), uma vez estabelecida a anquilose alvéolo-dentária, o dente será “renovado” ou “remodelado” às custas de tecido ósseo.

Nestas áreas não se observa ligamento periodontal, sendo o tecido ósseo depositado aleatoriamente com seus arranjos normais, substituindo a área. Segundo o autor, a detecção de um som oco à percussão vertical auxilia muito no diagnóstico diferencial da anquilose alvéolo-dentária. Essa sonoridade alterada decorre da perda do ligamento periodontal, uma vez que a transmissão da força ocorre diretamente de um corpo sólido mineralizado para outro, e a ressonância se faz ao longo do dente e de todo o osso adjacente.

A reabsorção inflamatória, por sua vez, é caracterizada pela presença de inflamação na área onde está se desenvolvendo o processo reabsortivo. Ao receberem um estímulo continuado, que sustenta esse processo inflamatório na área, as células clásticas mantêm sua ação sobre os tecidos mineralizados do dente. Dentre esses estímulos estariam: a pressão do aparelho ortodôntico, a pressão resultante da impacção dental, a presença de microrganismos e algumas enfermidades sistêmicas (SOARES, 2002).

De acordo com Andreasen e Andreasen (2001), a reabsorção radicular inflamatória externa é caracterizada por cavidades arredondadas no cimento e dentina, associadas a alterações inflamatórias no periodonto adjacente. Essa patologia decorre de lesões do ligamento periodontal e do cimento, associadas à contaminação bacteriana que leva à formação de pequenas cavidades de reabsorção na superfície radicular, de forma similar à reabsorção por substituição. Desta forma, uma vez ocorrida a mortificação pulpar, as bactérias e suas toxinas, por meio dos túbulos dentinários, chegam ao ligamento periodontal e provocam uma resposta inflamatória intensificando o processo de reabsorção. A reabsorção inflamatória é especialmente agressiva nos casos de reimplantes em pacientes de 6 a 10 anos de idade, pelo fato de apresentarem túbulos dentinários amplos e uma

fina camada de cimento. Radiograficamente a reabsorção pode ser vista após 6 semanas, como uma solução da continuidade do espaço do ligamento periodontal.

2.1.2 Mecanismo de ação

Bate² (1856, apud MASSLER, 1954) foi o pioneiro a discorrer sobre a reabsorção radicular dos dentes permanentes e relacioná-la com o trauma do ligamento periodontal.

Entretanto, ainda hoje, não se conhece com exatidão o mecanismo das reabsorções. Sabe-se, no entanto, que na patologia das reabsorções dentárias estão envolvidos aspectos e mecanismos relacionados à biologia celular, à inflamação, à auto-imunidade, à odontogênese e a à biopatologia óssea aguda (ESBERARD; ESBERARD; ESTRELA, 2002).

O osso é uma fonte de reserva de cálcio, fósforo e outros íons que participam dos mecanismos biológicos do corpo humano. Para a mobilização desses componentes, continuamente e em vários pontos do esqueleto, ocorrem repetidos ciclos de destruição e reconstrução óssea. Este mecanismo é denominado remodelação óssea e, em adultos saudáveis, a quantidade de osso formado corresponde à reabsorvida, mantendo-se constante a massa óssea (MANOLAGAS, 2000).

A remodelação óssea se faz às custas da atividade integrada dos osteoblastos, responsáveis pela produção do osso; dos clastos, que o destroem; e dos macrófagos. Este conjunto de células denomina-se unidade

² Bates S. Absorption. Br J Dent Sci 1856;1:256.

osteorremodeladora, sendo conhecido como BMU (RODAN; MARTIN, 1981). A remodelação óssea ocorre simultaneamente em vários pontos do esqueleto sendo regulada por fatores locais, mecanismos autócrinos, parácrinos e hormonais.

O controle hormonal da remodelação óssea ocorre por meio do paratormônio (PTH), da calcitonina, da forma biologicamente ativa da vitamina D3 e dos esteróides sexuais.

Diferentemente dos demais tecidos duros, os tecidos dentários mineralizados não são normalmente reabsorvidos. Várias hipóteses têm sido sugeridas para explicar tal fato (TROPE; CHIVIAN, 2002). Entretanto, não se conhece com exatidão os mecanismos que protegem os dentes e/ou inibem sua reabsorção (HAMMARSTRÖM; LINDSKOG, 1985).

Em trabalhos utilizando comparativamente cementoblastos e osteoblastos, Lindsokog, Blomlöf e Hammarström (1987) demonstraram que os primeiros não apresentam receptores para o PTH, justificando, bioquimicamente, porque não participam da remodelação óssea.

Atualmente, há indícios significativos que o ligamento periodontal e um fator inibidor de reabsorção presente no pré-cemento, cimento, pré-dentina e dentina poderiam constituir-se, cada um isoladamente ou em conjunto, em um escudo protetor para o dente, evitando, assim, o aparecimento das condições favoráveis à reabsorção e/ou mantendo afastadas da raiz dental as células responsáveis por ela. Acredita-se também que os restos epiteliais de Malassez da bainha radicular estejam relacionadas com a resistência a anquilose e à reabsorção substitutiva da raiz (TROPE; CHIVIAN, 2002).

A barreira celular, acima mencionada, interposta entre a dentina e os clastos pode ser considerada um fator de resistência à reabsorção, na medida em

que, a camada de cementoblastos protege os tecidos dentais pelo lado externo enquanto os odontoblastos evitam a reabsorção internamente (ANDREASEN; ANDREASEN, 1992).

Além das camadas celulares, a presença da pré-dentina e do pré-cimento são elementos importantes no mecanismo de resistência às reabsorções. As células clásticas não são capazes de aderir a suas superfícies e são atraídas quimiotaticamente apenas pelos tecidos mineralizados (RODAN; MARTIN, 1981).

Desta forma, uma vez rompidas ou danificadas as camadas de pré-dentina ou pré cimento, por diferentes agentes agressores, há exposição da matriz mineralizada dos tecidos dentais (cimento e dentina) e o processo de reabsorção radicular se inicia. Acredita-se que a exposição de hidroxiapatita (principal componente inorgânico do tecidos dentais mineralizados) e/ou determinadas glicoproteínas sejam os principais responsáveis pela ativação do mecanismo de reabsorção (TROPE; CHIVIAN, 2002).

Acredita-se, ainda, que o mecanismo de reabsorção dos tecidos duros dentais seja muito semelhante à reabsorção óssea, já que as células envolvidas no processo assemelham-se tanto na forma como em função.

As células que participam do processo de reabsorção radicular são, especialmente, os clastos e blastos. Os blastos são células que recobrem a superfície mineralizada, tanto do osso (osteoblastos) quanto da raiz dentária (cementoblastos). Quando a camada destas células é alterada - por exemplo, por trauma nos casos de avulsão -, a superfície mineralizada é exposta e as células clásticas são atraídas para a área, onde iniciarão o processo reabsortivo (CONSOLARO, 2002).

O processo de reabsorção radicular ocorre por meio de dois eventos principais: a decomposição do componente orgânico e a dissolução da porção mineral (TEITELBAUM, 2000).

O primeiro se deve à ação de enzimas (catepsina, collagenase e gelatinase B) liberadas pelo retículo endoplasmático rugoso das células clásticas (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001). Ao mesmo tempo, ocorre a acidificação do meio, decorrente da liberação de íons de hidrogênio, catalisados pela enzima anidrase carbônica, liberada pelo citoplasma e membrana plasmática das células clásticas (LAITALA; VÄÄNÄNEN, 1993). Com o compartimento de reabsorção acidificado, o processo de reabsorção é continuado e a porção mineral do tecido é dissolvida.

Na reabsorção por substituição, por sua vez, após a constituição das lacunas de reabsorção, há deposição de tecido osteóide pelos osteoblastos, o qual será mineralizado, até que toda a cavidade esteja preenchida por osso neoformado no local (HILL; ORTH, 1998).

O processo de reabsorção radicular, assim como o processo de remodelação óssea, é controlado por mecanismos autócrinos e parácrinos e hormonais (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Os mecanismos responsáveis pela ativação e desativação dos osteoclastos parecem estar relacionados com aqueles que atuam nos osteoblastos, resultando em ação, tanto na deposição quanto na reabsorção. Sabe-se que os osteoblastos são estimulados por agentes reabsortivos (hormônio PTH), os quais liberam um fator solúvel (interleucina 6- IL 6) que se comunica com o osteoclasto, estimulando sua atividade, contribuindo, dessa forma, com o mecanismo regulador de deposição e reabsorção óssea. Além disso, alguns autores têm demonstrado que

a IL-6 induz o osteoblasto a aumentar a produção de citocinas que podem aumentar o processo de osteoclastogênese (GREENFIELD; BI; MIYAUCHI, 1999; OHMORI; HAMILLTON, 1994).

A descoberta do chamado fator de ativação de osteoclastos (OAF) incitou um grande interesse sobre os fatores locais e citocinas que regulam a função dos osteoclastos. As citocinas atuam como mensageiros intercelulares e são derivadas de células mononucleares da medula óssea ou diretamente de células ósseas, podendo estar incorporadas à matriz óssea e serem liberadas de uma forma biologicamente ativa durante a reabsorção. A interleucina -1 (IL-1) é a mais potente das interleucinas que agem diretamente na estimulação de reabsorção óssea, tendo sua ação mediada pelos odontoblastos (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Fatores de liberação local como as prostaglandinas E, F, A e B, a prostacilina e o lipopolissacarídeo bacteriano têm sido mostrados como estimuladores de reabsorção óssea (CHAMBERS, 1985).

As condições ambientais também podem afetar a atividade osteoclástica. A acidose estimula a liberação de mineral do osso e a hipercalcúria - um pH baixo no meio - também estimula diretamente a reabsorção mediada pelas células osteoblásticas. Para Andreasen e Andreasen (2001), tal informação é de suma importância, uma vez que tem implicação direta na inflamação, pois a reabsorção óssea pode ser aumentada numa doença inflamatória, simplesmente porque o local geralmente tem um pH reduzido.

Ainda, segundo esses autores, um traumatismo mecânico ao periodonto ou aos tecidos circunvizinhos, pode levar ao surgimento contínuo de irritantes, antígenos ou produtos bacterianos tóxicos resultando em reações imunológicas que

desencadearão a liberação de mediadores não específicos, ativando, assim, as vias de inflamação.

Nas contaminações bacterianas, a reabsorção é um importante mecanismo na luta contra estes agentes, pois ocorre na tentativa de eliminar bactérias ou seus produtos do interior dos túbulos dentinários e canal radicular, enquanto ocorre, concomitantemente, a formação de um tecido de granulação na área de reabsorção óssea periapical para a defesa contra os microorganismos aí existentes (BARRET; KENNY, 1997).

Tem-se atribuído um papel importante da resposta imune no processo de reabsorção radicular. Alguns antígenos no nosso organismo são classificados como seqüestrados. Pelas localizações especiais ou formação tardia, estes não são apresentados ao sistema imunológico durante o desenvolvimento da tolerância natural ou “construção da memória”. Quando expostos ao sistema imunológico já em atividade, desencadeiam respostas imunopatológicas. Este é o caso do cristalino e dos espermatozóides.

As proteínas dentinárias estão, desde a odontogênese, escondidas e isoladas tanto pelo lado interno como externo. Como antígenos seqüestrados, poderiam, quando “expostas”, induzir fenômenos auto-imunes e participar da etiopatogenia das reabsorções dentárias.

Hidalgo (2001) reforçou esta hipótese ao avaliar a resposta imune de pacientes que sofreram trauma dental com subsequente reabsorção radicular. Foram comparados soros de pacientes com reabsorção radicular inflamatória apical ativa por substituição; e de pacientes saudáveis sem quaisquer evidências de reabsorção radicular. O autor verificou que os soros de pacientes com reabsorção dentária apresentavam quantidades maiores de IgG antiextrato dentinário humano e

antifrações, se comparados aos dos indivíduos controles, sendo possível traçar um perfil sorológico próprio e possivelmente identificador do processo. Foi ainda observado que a IgM sérica antiextrato dentinário humano e antifrações dos pacientes com reabsorção inflamatória estavam em quantidades maiores ou iguais aos demais grupos estudados. O autor concluiu que a dentina apresenta imunogenicidade e o perfil sorológico dos pacientes com reabsorção dentária pode ser identificado por análise bioquímica sangüínea. O seu delineamento preciso pode levar ao diagnóstico precoce da reabsorção dentária antes que seja detectada radiograficamente ou diagnosticada clinicamente.

Por fim, o autor apresentou, neste estudo, um esquema didático da etiopatogenia das reabsorções radiculares:

2.1.3 Tratamento das reabsorções externas

Para que seja instituído um protocolo de tratamento correto das reabsorções radiculares externas, faz-se necessário compreender o mecanismo de reabsorção dos tecidos duros, identificar o tipo de reabsorção, o possível agente causal e o estágio em que se encontra o processo.

A reabsorção inflamatória transitória não necessita de tratamento, pois é um processo de reparação que ocorre após injúrias de baixa intensidade nas estruturas periodontais. (SOARES; GOLDBERG, 2001).

Por outro lado, as reabsorções inflamatórias progressivas e as por substituição aumentam continuamente, necessitando rápida intervenção do profissional, a fim de prevenir sua instalação. No entanto, uma vez ativas, o tratamento tem como objetivo interromper ou estabilizar o processo de reabsorção (SOARES; GOLDBERG, 2001).

2.1.3.1 prevenção e/ou tratamento das reabsorções externas com medicamentos de uso intracanal

O tratamento das reabsorções radiculares externas está diretamente ligado à terapia endodôntica e ao uso de medicação intracanal e tem como objetivo eliminar as bactérias e seus produtos do interior dos canais radiculares, bem como prevenir ou estabilizar o processo de reabsorção externa.

O momento correto para a instituição da terapêutica endodôntica ainda desperta discussões. Segundo Kinirons, Boyd e Gregg (1999), nas reabsorções

decorrentes de traumatismo dental, a demora para a remoção da polpa favorece o aparecimento da reabsorção inflamatória, logo o tratamento endodôntico deve ser realizado, no máximo, após 20 dias do reimplante.

As recomendações da American Association of Endodontics - A.A.E. (2004), são relativas ao tempo extra-alveolar: se o dente permanecer por mais de 1 hora fora do alvéolo em meio seco, a endodontia deve ser realizada antes do reimplante; se o tempo não exceder 1 hora, deve-se considerar a possibilidade de revascularização em dentes com rizogênese incompleta; todavia em dentes com ápice fechado, endodontia deve ser realizada dentro de 7 a 14 dias após o reimplante.

O hidróxido de cálcio, ainda hoje, é a medicação de eleição para o tratamento das reabsorções, em razão de suas renomadas propriedades químicas tais como: atividade antimicrobiana, indutora de tecido mineralizado, atuação em células clásticas, entre outras. Entretanto, sua ação não é totalmente conhecida (ESBERARD; ESBERARD; ESTRELA, 2002).

Sabe-se que a melhor condição para favorecer a reabsorção dos tecidos duros é o pH ácido. O princípio do uso do hidróxido de cálcio nas reabsorções baseia-se no fato de que os produtos ácidos (ácido láctico), provenientes dos osteoclastos podem ser neutralizados, ajudando a prevenir a dissolução dos componentes minerais da dentina. Além disso, sua alta alcalinidade é desfavorável para a atividade da hidrolase ácida osteoclástica e por outro lado, favorável à fosfatase alcalina - elemento importante na formação de tecido duro (ESBERARD; ESBERARD; ESTRELA, 2002).

Em 1981, Tronstad et al. verificaram mudanças de pH nos tecidos dentários com o uso do hidróxido de cálcio intracanal, que inativou os clastos e

estimulou o reparo. Estes resultados confirmaram que a reabsorção inflamatória pode ser limitada pelo uso do hidróxido de cálcio, favorecendo, assim, o tratamento de dentes com reabsorções dentárias.

Para Hammarström et al. (1986), a elevada alcalinidade do hidróxido de cálcio induz a formação de um tecido mineralizado pela estimulação de enzimas (fosfatase alcalina e adenosina trifosfatase cálcio-dependente) e inibição da fosfatase ácida osteoclástica.

Foster, Kulild e Weller (1993) demonstraram que íons H^+ e Ca^{++} , obtidos pela dissociação do hidróxido de Cálcio utilizado como medicação intracanal, sofrem difusão pela dentina até a superfície externa radicular. Os autores salientaram que a difusão da medicação intracanal, particularmente aquelas à base de hidróxido de cálcio, permite que, na superfície radicular externa, ocorram mudanças de pH suficiente para que, em alguns casos, ocorra a interrupção ou redução do processo.

Apesar do hidróxido de cálcio ser a medicação mais indicada para tratamento e prevenção das reabsorções, alguns estudos têm verificado que nas situações em que ocorrem danos maiores no ligamento periodontal, principalmente nos casos de reimplantes tardios, o uso de hidróxido de cálcio não tem sido efetivo para controlar as reabsorções substitutivas (HAMMARSTRÖM et al., 1986). e, quando usado por período prolongado, pode estimular o aparecimento de anquilose (ANDREASEN; KRISTERSON, 1981; LENGHEDEN; BLOMLÖF; LINDSKOG, 1991a).

Lengheden, Blomlöf e Lindskog (1991b) estudaram o efeito do tratamento prolongado com hidróxido de cálcio sobre a cicatrização de dentes de macacos reimplantados com ligamento periodontal contaminado. O Grupo I foi tratado com hidróxido de cálcio durante três semanas e o Grupo II, durante cinco semanas. O

Grupo III (controle) não recebeu tratamento e apresentou reabsorção inflamatória significativamente maior que os grupos. A quantidade de anquilose dos Grupos I e II (aproximadamente dois terços da superfície radicular) foi semelhante, entretanto, observou-se significativa diferença quanto ao tipo de anquilose. No grupo tratado com hidróxido de cálcio por 3 semanas (GI), a anquilose não associada com reabsorção foi o dobro da encontrada no tratado com a medicação por 5 semanas (GII), sendo que o padrão de anquilose mudou com o tempo, o que sugeriu um efeito necrosante deste material. Os autores concluíram que em dentes com comprometimento do ligamento periodontal, o tratamento prolongado com hidróxido de cálcio pode provocar reabsorções radiculares por substituição.

Trope et al. (1992) examinaram histologicamente o processo de reparo de incisivos de cães reimplantados experimentalmente após injúria intencional do ligamento periodontal. Os canais radiculares dos dentes reimplantados foram ou não infectados e tratados com hidróxido de cálcio por períodos longos (8 semanas) ou curtos (1 semana). Os autores concluíram que o período de permanência do hidróxido de cálcio não interferiu no processo de reparação, quando o tratamento endodôntico foi iniciado 14 dias após o reimplante.

Vanderas (1993), por meio de uma revisão da literatura sobre a utilização de curativos de demora em dentes traumatizados, concluiu que o hidróxido de cálcio era capaz de controlar a reabsorção inflamatória, porém, as áreas de anquilose eram maiores quando do uso deste medicamento. O autor afirmou ainda que a medicação intracanal ideal para a prevenção ou para o combate das reabsorções radiculares externas, ainda não foi encontrada e, em vista disto, várias opções têm sido estudadas e propostas na literatura.

Estudos têm avaliado, para o uso intracanal, o emprego de substâncias que possuem propriedades inibidoras das reabsorções ósseas (calcitonina, alendronato, acetolozamida) e que já foram testadas como substâncias para tratamento de superfície em reimplantes tardios.

Pierce, Berg e Lindskog (1988) avaliaram, em macacos, os efeitos da aplicação intracanal da calcitonina no controle de reabsorções inflamatórias em dentes reimplantados com contaminação do canal radicular e com ligamento periodontal necrótico. Os autores verificaram que a calcitonina foi eficiente no tratamento das reabsorções inflamatórias instaladas.

Mori (2005) estudou os efeitos de substâncias anti-reabsortivas (alendronato, acetazolamida, nitrato de gálio e pasta de hidróxido de cálcio) usadas como medicação intracanal em dentes de ratos avulsionados, mantidos a seco por trinta minutos e reimplantados tardiamente. Os resultados mostraram que, tanto as soluções de alendronato e nitrato de gálio como a pasta de hidróxido de cálcio, limitaram a reabsorção dentária, mas não impediram o seu aparecimento. Já com o uso da solução de acetazolamida, a reabsorção radicular esteve ausente aos 60 dias, comprovando sua eficácia na inibição da reabsorção radicular.

2.1.3.2 prevenção e/ ou tratamento das reabsorções radiculares por meio do tratamento de superfície radicular

Os primeiros estudos a respeito do tratamento de superfície radicular por meio de substâncias químicas datam do final do século IX. Tais estudos

preconizavam a aplicação de ácidos na superfície dentinária, de forma a favorecer a terapia periondotal (ALMEIDA; MELO; SARAIVA, 2003).

Desde então, o tratamento da superfície radicular com substâncias químicas e, mais recentemente, com a aplicação de radiação laser, tem sido proposto como coadjuvante da terapia periodontal convencional, permitindo que, por meio da descontaminação e biomodificação das superfícies, o processo de cicatrização seja favorecido por uma nova inserção de fibras e células do ligamento periodontal (ALMEIDA; MELO; SARAIVA, 2003).

Dentre as substâncias químicas, a literatura tem destacado o emprego de agentes desmineralizantes, os quais promovem o condicionamento ácido da raiz, a abertura dos túbulos dentinários e a exposição de fibras colágenas denominadas de zona de desmineralização (GARRETT; CRIGGER; EGELBERG, 1978). Tais substâncias favorecem a estabilização do coágulo e, conseqüentemente, a adesão de fibras e células do tecido conjuntivo, seguido de formação de novo cemento, responsável pela nova inserção conjuntiva (POLSON; HANES, 1987).

Woodyard et al. (1984) investigaram, em dentes de macacos, o uso do ácido cítrico em procedimentos de recobrimento radicular, encontrando ganho de inserção conjuntiva nos dentes que tiveram a superfície radicular condicionada.

Em contraposição, Cogen et al. (1984) avaliaram superfícies radiculares tratadas e colocadas em cultura de fibroblastos humanos e verificaram que o ácido cítrico não proporcionou vantagens sobre o tratamento mecânico, no que se refere à maior inserção e crescimento celular.

Blomlöf (1996) comparou *in vitro* o efeito do uso de agentes de baixo pH e de pH neutro sobre dentes saudáveis de macacos e periodontalmente afetados de humanos. Os resultados indicaram uma alta capacidade do EDTA (a 24% por 3

minutos) em expor seletivamente fibras colágenas quando comparado com ácido cítrico e fosfórico. O autor constatou que o EDTA não só removeu componentes minerais da superfície dentinária e cementária, como também manteve a integridade das fibras colágenas, que poderiam ser comprometidas pelo uso de agentes de baixo pH.

Babay (2001) analisando a adesão de fibroblastos de gengiva humana sobre superfícies radiculares com doença periodontal e tratadas com raspagem e/ou condicionamento, constatou que não houve adesão de fibroblastos nas faces não instrumentadas. As superfícies raspadas mostraram-se lisas e aplanadas com grupos de células localizadas e, quando tratadas quimicamente, apresentaram-se mais rugosas e com fibroblastos espalhados. As superfícies tratadas com ultra-som, EMS ou Amdent, não apresentaram células, porém quando condicionadas, houve um aumento significativo do número de fibroblastos aderidos. Essas células eram planas, com microvilosidades e filipodos, formando uma multicamada que cobria a superfície. O autor concluiu que os fibroblastos não aderiram em dentes com doença periodontal não tratados; apresentando-se em pequeno número sobre superfícies raspadas e abundantes nas raízes condicionadas, sem diferença entre os agentes utilizados. Além disso, foi observado que as células aderiram mais sobre superfícies rugosas do que lisas.

Nos casos de avulsão dental, onde o período extra-alveolar é longo, têm sido preconizado, antes do reimplante, a remoção do ligamento periodontal necrosado e o tratamento da superfície da raiz com diferentes substâncias (ácido cítrico, fluoretos, enzimas, bifosfanatos, hipoclorito de sódio, vitamina C, matriz derivada do esmalte, calcitonina) objetivando prevenir principalmente a reabsorção por substituição. Nestas situações o prognóstico é bastante desfavorável, pois se

sabe que quando há necrose do ligamento periodontal, existe maior tendência a anquilose e reabsorção externa da raiz (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Bjorvatin e Massler (1971) avaliaram a influência do tratamento de superfície com solução saturada de fluoreto estanhoso a 10% e pH 2,2, em dentes de ratos reimplantados tardiamente. Os autores verificaram que utilização do flúor reduziu as áreas de reabsorção radicular e duas teorias foram propostas para explicar este achado: poderia haver a formação de fluorapatita, que é mais resistente à reabsorção, ou o flúor teria efeito inibitório na diferenciação dos clastos.

Segundo a American Association of Endodontics - A.A.E. (2004), o fluoreto de sódio (em concentração entre 1 % a 2,4% por 20 minutos), devido ao fato de reduzir a severidade da reabsorção dentária, é o medicamento de escolha para o tratamento de superfície de dentes avulsionados e reimplantados tardiamente.

Zervas, Lambrianidis e Karabouta-Vulgaropoulou (1991) estudaram o efeito da desmineralização de superfícies dentinárias sobre a cicatrização periodontal em dentes de cães reimplantados tardiamente. Os períodos de observação foram de 3, 14 e 56 dias, sendo que, para o último período, os dentes receberam tratamento endodôntico e obturação com gutapercha. Durante os períodos iniciais, os dentes tratados com ácido cítrico apresentaram características mais favoráveis ao processo de cicatrização, com menor extensão e menor número de cavidades de reabsorção e maior reinserção do ligamento periodontal. No último período de observação, o grupo desmineralizado apresentou grandes cavidades ativas de reabsorção inflamatória e a reabsorção por substituição foi a principal característica. Os resultados observados levaram os autores a concluir que a desmineralização tem um efeito geralmente positivo no início da cicatrização após o

reimplante. Entretanto, leva a características desfavoráveis em períodos tardios, não sendo indicada antes do reimplante.

Iqbal e Bamaas (2001) determinaram o efeito da matrix derivada de esmalte (EMDOGAIN) sobre a cicatrização periodontal em incisivos de cães reimplantados. Os incisivos foram reimplantados após 15, 30 e 60 minutos de período extra-alveolar a seco com ou sem a aplicação do EMDOGAIN. A polpa dental foi removida e os animais foram sacrificados após os períodos de oito e 12 semanas. Os parâmetros histológicos estudados foram: cicatrização periodontal, reabsorção de superfície, inflamatória e de substituição. A incidência de cicatrização periodontal foi inversamente proporcional ao período extra-alveolar. O Grupo tratado com EMDOGAIN apresentou uma maior incidência de cicatrização do ligamento periodontal, enquanto o controle uma maior incidência de anquilose.

Levin et al. (2001) avaliaram o efeito da aplicação tópica de alendronato sobre a reabsorção radicular de dentes de cães reimplantados. Foram utilizados 82 dentes, sendo que 70 foram deixados em meio seco por 40 ou 60 minutos. Destes dentes, 38 tiveram as superfícies radiculares tratadas com alendronato por cinco minutos e os restantes foram usados como controle. Em 12 dentes que não ficaram em meio seco, foram realizados defeitos, com 5mm de espessura, no cimento. Metade deste grupo foi tratado com alendronato e, em seguida, os espécimes foram reimplantados, sendo a outra metade usada como controle. Após quatro meses, os animais foram sacrificados e as peças analisadas histologicamente. O processo de cicatrização foi observado em todos os 12 dentes que tinham defeito no cimento, indicando que esta solução não impediu a cementogênese. O grupo no qual os dentes foram armazenados a seco e tratados com alendronato, apresentou melhor cicatrização do ligamento periodontal que o grupo controle, com diferença

estatisticamente significativa. Neste grupo observou-se também uma menor perda de estrutura dentinária radicular devido ao processo de reabsorção.

Mori e Garcia (2002) analisaram o efeito do tratamento da superfície radicular com acetolamida em dentes de ratos avulsionados e reimplantados. Foram utilizados 54 incisivos centrais, divididos em três grupos: no grupo I, a superfície radicular foi tratada com solução de hipoclorito de sódio a 1%; no grupo II, com solução de hipoclorito de sódio a 1% seguido da aplicação de fluoreto de sódio a 2%; no grupo III, após o uso do hipoclorito de sódio a 1%, foi utilizada a solução de acetazolamida a 5%. Todos os grupos tiveram seus canais preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio e, em seguida, os dentes foram reimplantados em seus alvéolos. Passados 15, 60 e 90 dias do reimplante, os animais foram mortos e as peças obtidas, processadas em laboratório, para análise em microscópio de luz. Os resultados mostraram que nenhum tratamento de superfície proposto foi eficiente para evitar a ocorrência da anquilose e das reabsorções inflamatória e por substituição.

Os trabalhos relacionados ao tratamento das superfícies radiculares por meio da radiação laser serão abordados na segunda parte da revisão da literatura: radiação laser.

2.1.3.3 tratamento cirúrgico das reabsorções radiculares externas

Como foi dito anteriormente, o prognóstico das reabsorções radiculares externas é duvidoso, e mesmo nas situações nas quais se realiza tratamento correto

com intervenção endodôntica e colocação de medicação intracanal, muitas vezes não se consegue conter o processo, sendo necessária a intervenção cirúrgica.

Várias técnicas cirúrgicas têm sido preconizadas para o tratamento das reabsorções inflamatórias progressivas, em especial, para as reabsorções cervicais (ISIDOR; STOCKHOLM, 1992; ST GEORGE; DARBAR ; THOMAS, 2006).

Para cavidades rasas de pequena extensão, após a curetagem e remoção do tecido de granulação, indica-se uma plastia na cavidade com o objetivo de regularizar suas bordas e o alisamento das paredes, ou o tratamento da superfície da raiz. Nas cavidades mais profundas, faz-se necessário o selamento com materiais obturadores (MATTAR; MATTAR, 2003).

Os defeitos radiculares provocados pelas reabsorções radiculares externas têm sido selados com diferentes materiais: amalgama, ionômero de vidro e resina composta (AL-NAZHAN, 1991; SCHERER; DRAGOO, 1995; WHITE, 1998) .

Recentemente, estudos têm proposto o selamento destas cavidades com o agregado trióxido mineral (BARATTO FILHO et al., 2005; WHITE JR; BRYANT, 2002).

- Agregado trióxido mineral (MTA)

O MTA foi idealizado e desenvolvido, no final da década de 90, pela equipe de pesquisadores da Universidade de Loma Linda, Califórnia -EUA, liderados pelo Professor Mahmoud Torabinejad, com o objetivo de selar todas as comunicações entre o sistema de canais radiculares e a superfície externa do dente. Este material foi lançado com o nome comercial MTA Pro Root.

Três anos depois, Lee, Monsef e Torabinejad (1993) publicaram o primeiro estudo a respeito desse material. Neste estudo, os autores avaliaram

comparativamente a capacidade do MTA, amálgama e IRM em selar perfurações radiculares, por meio de corante azul de metileno. Os resultados mostraram que o grupo do MTA apresentou menor infiltração quando comparado aos outros materiais testados e menor tendência ao extravasamento.

A partir de então, várias pesquisas têm sido realizadas com esse material analisando-se a sua biocompatibilidade, suas propriedades físicas e químicas, antimicrobianas, citotoxicidade, mutagenicidade, capeamento pulpar, a análise da capacidade seladora em obturações retrógradas, a adaptação marginal em M.E.V. bem como a sua utilização em perfurações radiculares.

Torabinejad et al. (1995) realizaram um estudo para determinar a composição química, pH e radiopacidade do MTA cinza e também comparar: tempo de presa, solubilidade e resistência à compressão do MTA em relação ao amálgama, Super-EBA e IRM. Os exames demonstraram que o MTA é composto de finas partículas hidrofílicas e seus principais componentes são: silicato tricálcio, aluminato tricálcio, óxido tricálcio e óxido de silicato, e pequenas quantidades de outros óxidos minerais e do óxido de bismuto que possui a propriedade de lhe conferir radiopacidade. O pH inicial era de 10,2 e aumentou para 12,5 três horas após ser misturado à água. O MTA apresentou maior radiopacidade que o Super-EBA e IRM. O tempo de presa do MTA foi de duas horas e 45 minutos, e, sendo que, em 24 horas sua resistência à compressão foi de 40 MPa, aumentando para 67 MPa após 21 dias. Com exceção do IRM nenhum dos materiais testados apresentou solubilidade.

Holland et al. (2001) compararam a capacidade de reparo do MTA e do cimento Sealapex quando aplicados em perfurações laterais intencionais produzidas em dentes de cães. Decorridos cento e oitenta dias as amostras foram analisadas

histologicamente. Foi verificado que os espécimes selados com MTA mostraram deposição de cimento nas áreas junto às perfurações e ausência de inflamação. As amostras seladas com Sealapex mostraram junto às perfurações inflamação crônica em todos os espécimes e pequena formação de cimento em apenas três dentes. Os autores concluíram que os resultados obtidos nos espécimes obturados com MTA foram bem superiores quando comparados ao selamento das perfurações com Sealapex.

Balto (2004) avaliou a morfologia e fixação de fibroblastos do ligamento periodontal humano ao MTA, por meio da digitalização de imagens de microscópio eletrônico. O material foi colocado em cavidade apical de trinta fatias de dentes humanos extraídos unirradiculares. Os espécimes foram divididos em dois grupos de quinze fatias cada um (material recém misturado e material já endurecido). Para cada grupo experimental, cinco fatias foram usadas para observação em um período de 4, 8 e 24 horas. Os espécimes foram colocados em cultura de células agrupados em 96 placas com 1 mL de células fibroblásticas do ligamento periodontal humano em suspensão e preenchidos com MTA. Os resultados mostraram morfologia normal das células colocadas em controle negativo. No controle positivo foram encontradas poucas células esféricas com faces lisas e muito mais células com faces ásperas. Além disso, maior parte delas não mostrou nenhuma fixação ao substrato. Observações similares foram verificadas no grupo do MTA fresco. No grupo do MTA endurecido as células estavam circundadas e achatadas, exibindo faces lisas, porém aparentavam estar compactamente fixadas ao MTA. O autor concluiu que a qualidade e a quantidade de células fixadas ao material retrobturador poderiam ser usadas como critério para avaliar a toxicidade do material.

Main et al. (2004) avaliaram o processo de reparo em 16 dentes humanos perfurados e selados com MTA, por meio de exame radiográfico. Foram feitas tomadas radiográficas no período pré-operatório, imediatamente após o tratamento e após um ano. As perfurações se encontravam nas seguintes áreas dentais: três no ápice, três na furca, cinco em áreas laterais da raiz e cinco em faixa ou em zip. Foi verificado, nos controles radiográficos realizados nos períodos de 12 a 33 meses, que em todos os 16 casos houve o reparo no local da reabsorção. Assim como neoformação óssea e desaparecimento da lesão em todos os dentes que apresentaram áreas radiolúcidas nas radiografias pré-operatórias. Baseados nos resultados obtidos os autores concluíram que o MTA provou ser um material selador efetivo para perfurações radiculares e se mostrou promissor no que se refere a um melhor prognóstico de dentes com perfuração radicular.

Lage-Marques, Malheiros e Amorim (2005), em uma abordagem clínica, descreveram a técnica empregada com o MTA em obturações retrogradas, apicificações, reabsorções apicais e perfurações de furca, nos diferentes terços radiculares. Todos os casos clínicos apresentados revelaram ótimos resultados. Os autores ressaltaram as seguintes propriedades e vantagens do MTA:

- Apresenta fácil manipulação e boas características de radiopacidade e quando incorporado à água destilada ou soro fisiológico, atinge propriedades físicas adequadas e excelente potencial hidrogeniônico.
- É um material hidrofílico que tem a capacidade de se converter em gel coloidal que se cristaliza com expansão, incrementando a capacidade de selamento marginal das cavidades.
- Pela sua biocompatibilidade é capaz de atuar como revestimento biológico de perfurações em diversas localizações.

- A sua composição favorece a formação de cimento perirradicular, funcionando também na indução de barreira dentinária quando utilizado em tratamento conservador diretamente depositado sobre a polpa viável.
- Não exige campo operatório absolutamente seco para que mantenha as suas propriedades físicas, químicas e biológicas.
- Apresenta potencial hidrogeniônico altamente alcalino (12,0) tornando o meio inadequado para o desenvolvimento de microorganismos por longo período.

No ano de 2001, a empresa brasileira Ângelus desenvolveu um MTA nacional de custo inferior, porém, com propriedades e composição similares ao MTA Pro Root. E, recentemente no ano de 2004, a mesma empresa lançou o MTA branco.

Regalado et al. (2002) avaliaram as variações de pH do MTA Pro Root, MTA Angelus, cimento Portland cinza e cimento Portland branco. Os cimentos foram espatulados na proporção de 0,18 mg de pó para 60µL de água deionizada e colocados em cilindros de polietileno com cinco milímetros de comprimento. Utilizou-se cinco amostras de cada cimento para realizar as leituras de pH, através do pHmetro Orion. As leituras foram realizadas nos tempos de 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, uma hora, duas horas, seis horas, 24 horas e 48 horas. O Portland branco teve um pH menor que os outros cimentos com diferença estatisticamente significativa nos tempos 15 e 30 minutos. Nos demais tempos não houve diferença estatística significativa entre os materiais.

Matt et al. (2004) avaliaram a capacidade de selamento do MTA cinza e branco como barreira apical em retrocavidades de 2 e 5 mm de profundidade e a microdureza proporcionada por essas barreiras. Foram utilizadas 44 raízes preparadas de forma a simular ápices abertos. As amostras foram obturadas

imediatamente após a colocação das barreiras ou depois de 24 horas. Os autores verificaram que ocorreu menor infiltração de corante azul de metileno nas amostras seladas com MTA cinza; as obturações feitas após 24 horas permitiram uma menor infiltração do que os dentes obturados imediatamente e as barreiras de 5 mm demonstraram maior microdureza do que a de 2 mm. Desta forma, as retroobturações realizadas com MTA cinza, após o período de 24 horas, e com 5mm de espessura, provaram ser mais eficazes como barreira apical.

Asgary et al. (2005) foram os primeiros a realizarem um estudo para a verificação das diferenças existentes na composição química do MTA branco e do MTA cinza. As principais diferenças encontradas entre os dois cimentos foram as maiores concentrações de óxido de alumínio (+122%), óxido de magnésio (+130%) e principalmente óxido de ferro (+1000%) presentes na composição do MTA cinza. Por outro lado os dois tipos de cimento possuem como seus principais componentes o óxido de cálcio, sílica e o óxido de bismuto.

Parirokh et al. (2005) realizaram capeamento pulpar direto em 24 dentes de cães com o MTA cinza e o MTA branco. Foi realizada a análise histológica nos períodos de uma e duas semanas após o tratamento. Foi observado, após uma semana, a formação de ponte de dentina, tanto nos espécimes tratados com MTA cinza, como nos tratados com MTA branco, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

Ribeiro et al. (2005) avaliaram *in vitro* a genotoxicidade e citotoxicidade do MTA branco e regular pelo teste do cometa e teste de exclusão pelo azul de tripan, respectivamente. Células do linfoma murino foram expostas às duas formas de apresentação do MTA nas concentrações finais de 1 a 1.000 µg/mL por 3 horas a 37°C. Os resultados mostraram que ambos os compostos testados não produziram

efeito genotóxico em todas as concentrações testadas e nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) foi observada na citotoxicidade. Os autores concluíram que o MTA regular e branco não são genotoxinas e não são capazes de interferir na viabilidade celular conforme avaliado pelo teste do cometa e ensaio do azul de tripan, respectivamente.

No ano seguinte, Aranha et al. (2006) avaliaram a citotoxicidade do MTA-branco (ANGELUS) sobre a morfologia e o metabolismo de células odontoblastóides MDPC-23, de acordo com o tempo de armazenagem deste material em meio de cultura. Foram confeccionados 24 corpos-de-prova, os quais foram imersos em meio de cultura DMEM pelos períodos de 24 horas (Grupo1) ou 7 dias (Grupo 2). Os extratos obtidos nos diferentes períodos foram aplicados sobre células odontoblastóides MDPC-23 cultivadas por 72 horas ($30.000 \text{ células/cm}^2$). O metabolismo celular foi avaliado em 10 espécimes, utilizando-se para isto o teste de MTT. Em dois espécimes representativos de cada grupo, as células foram processadas para avaliação de sua morfologia em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Além disso, os corpos-de-prova de cada grupo experimental tiveram suas características de superfície também avaliadas em MEV. Os autores verificaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos 1 e 2 e entre eles e o Grupo 3. Semelhante organização celular e morfologia foram observadas entre todos os grupos. Porém um menor número de células ocorreu nos Grupos 1 e 2 quando estes foram comparados ao Grupo controle. Notável homogeneidade de superfície foi observada nos corpos-de-prova, caracterizando a baixa solubilidade dos componentes do material em meio aquoso. Os autores concluíram que o cimento MTA-Branco apresenta discreto efeito citotóxico para as células de linhagem odontoblástica MDPC-23 em cultura.

2.2 Radiação laser

2.2.1 Interação radiação laser-tecidos dentais

A luz laser é uma radiação eletromagnética caracterizada por um determinado comprimento de onda, amplitude e frequência. Difere da luz comum por ser pura ou coerente, monocromática e colimada, ou seja, possui apenas um comprimento de onda e cor, propaga-se numa única direção e de forma paralela, razão pela qual não diverge significativamente a partir de sua fonte até mesmo em grandes distâncias.

Os aparelhos laser são constituídos por três componentes principais: o meio ativo composto por um conjunto de átomos ou moléculas nos estados sólido (ex: rubi, Nd:YAG, Er:YAG), líquido (laser de corante: rodamina) ou gasoso (ex: CO₂, Ar, He-Ne); uma cavidade ressonante que abriga o meio ativo, além de possuir nas suas extremidades um conjunto de espelhos colimadores (espelho de reflexão total de reflexão parcial); e um mecanismo de bombeamento (fonte de energia) responsável pela estimulação do meio ativo.

O processo de produção da radiação laser pode ser descrito sucintamente da seguinte forma: ao receber um bombeamento ou uma fonte de energia, os elétrons dos átomos ou moléculas do meio ativo mudam de órbita de modo a ficarem em um nível superior de energia, afastando-se do núcleo do átomo e transformando-se em um elétron excitado. Por ser um nível menos estável, rapidamente o elétron tenderá a voltar para o nível de energia anterior, emitindo assim um fóton de energia (um quantum). Este processo é denominado emissão espontânea de energia.

Quando um elétron, já no estado excitado, recebe um fóton de energia, ao retornar para seu estado mais estável, ele libera dois quanta de energia, agindo, desta forma, como um amplificador de radiação. Este processo é a origem da emissão dos lasers e é denominado como emissão estimulada de energia (CECCHINI, 1995).

A partir do momento em que a energia laser sai da cavidade ressonante pelo espelho semitransparente, ela pode ser entregue ao seu alvo através de vários tipos de sistemas: braço articulado, guia de onda e fibra óptica. Essa última é indicada para aplicações odontológicas e é encontrada em uma variedade de diâmetros entre 200 a 400 microns. A fibra óptica, quando utilizada em modo contato (fibra tocando no tecido alvo), permite a sensibilidade tátil do usuário.

Quando entregue ao tecido alvo, a energia laser pode ter quatro diferentes modos de interação: ser refletida para fora da superfície, não provocando efeito sobre esta; ser espalhada de forma a se difundir por uma vasta área, provocando efeitos difusos e fracos; ser transmitida diretamente através do tecido, não interagindo com o mesmo e, finalmente, ser absorvida pelo tecido, causando, assim, um efeito específico neste local (CECCHINI, 1995).

Vários fatores interferem na quantidade de absorção pelo tecido alvo: o comprimento de onda; o modo de emissão laser (pulsátil ou contínuo); a densidade de potência; a duração da exposição; a especificidade do laser empregado em relação ao tecido alvo; as características do tecido irradiado (composição, pigmentação, conteúdo de água, grau de tensão, vascularização); a presença de refrigeração externa (CECCHINI, 1995).

Existem dois grandes grupos de lasers utilizados em Odontologia, classificados de acordo com sua potência e o mecanismo de interação com os tecidos: lasers de baixa intensidade de energia (LILT – Low Intensity Level

Treatment) e lasers de alta intensidade de energia (HILT – Hight Intensity Laser Treatment).

Os lasers de baixa intensidade atuam em nível celular, através de interação fotoquímica, podendo promover aumento do metabolismo celular e, conseqüentemente, induzir diferentes efeitos gerais, tais como analgésico, antiinflamatório e biomodulativo. Estes têm sido indicados nos casos de aftas, herpes labial, quelite angular, trismos, parestesias, hipersensibilidade dentinária, pós-cirurgias, pós-intervenções endodônticas (BRUGNERA JUNIOR; SANTOS; BOLOGNA, 2003).

Dentre os lasers de baixa potência, os mais utilizados têm sido os de AsGA (Arsênio-Gálio), AsGaAl (Arsênio-Gálio-Alumínio), HeNe (Hélio-Neônio), InGaAP (Índio- Gálio-Alumínio- Fósforo).

O *laser de alta intensidade* promove uma interação fototérmica ou fotomecânica. Geralmente, quando a energia laser é absorvida pelo tecido, esta é transformada em energia térmica (calor), provocando efeitos específicos nos tecidos e, dependendo da quantidade de calor presente, podem ocorrer: desnaturação protéica e coagulação - 60° C a 100° C; vaporização, desintegração tecidual, ablação e corte - acima de 100° C; e carbonização e queima - acima de 300° C (CECCHINI, 1995).

Dentre os lasers de alta potência mais utilizados em Odontologia, podemos destacar os lasers de CO₂ (Dióxido de Carbono), Nd:YAG (Neodímio: Ítrio-Alumínio-Granada), Er:YAG (Érbio: Ítrio- Alumínio- Granada); Ho:YAG (Hólmio: Ítrio-Alumínio-Granada), Argônio e Diodos Semicondutores.

Os lasers de alta potência têm sido indicados na prevenção de cáries, no tratamento da hipersensibilidade dentinária, limpeza e selamento de fóssulas e

fissuras, na remoção da porcentagem final de tecido cariado, na gengivectomia, gengivoplastia, frenectomia e para obtenção de redução microbiana no interior dos canais radiculares, apicectomias e preparos cavitários e também no selamento dos túbulos dentinários (CECCHINI, 1995; COZEAN et al., 1997; HAYPEK; CARDOSO; EDUARDO, 2001; LAGE-MARQUES, 1997; MEHL et al., 1999).

As pesquisas com laser na área odontológica iniciaram-se na década de sessenta. Stern e Sogannaes (1964) aplicaram *in vitro* o laser de rubi em tecidos dentais (esmalte e dentina). Os autores observaram que este tipo de laser formava cratera e fusão de esmalte e dentina e provocava a queima do tecido dentinário. Outros estudos foram realizados com o laser de rubi, entretanto, em decorrência de seu comprimento de onda (694,3 nm), não possui uma boa absorção pelo esmalte dental, sendo necessária a utilização de recursos como pigmentos para aumentar sua absorção.

Após os estudos iniciais com laser de rubi, objetivando uma melhor interação do laser com os tecidos dentais, outros lasers foram investigados para uso em odontologia, dentre eles: o laser argônio (Ar), o de dióxido de carbono (CO₂), o neodímio: ítrio-alumínio-granada (Nd:YAG) e o laser érbio: ítrio-alumínio-granada (Er:YAG).

Dentre os lasers indicados para uso odontológico os da família YAG (neodímio, érbio) têm se destacado. Estes possuem como meio ativo um cristal transparente de ítrio-alumínio-granada conhecido com Garnet cuja fórmula é Y₃Al₅O₁₂. Este cristal transparente pode estar mergulhado em íons de Neodímio, Érbio e Hólmio, proporcionando aos lasers Nd:YAG, Er:YAG e Ho:YAG diferentes comprimentos de onda: 1,06 µm, 2,94 µm e 2,10 µm, respectivamente.

2.2.2 Laser Er:YAG

O laser Er:YAG foi introduzido na década de setenta por Zharikov et al. (1975). Este laser opera em regime pulsado, seu comprimento de onda está situado em 2,94 μm na região do Infravermelho próximo no espectro eletromagnético e utiliza fibras ópticas como sistema de entrega de feixe.

O laser Er: YAG apresenta grande absorção pela água e hidroxiapatita, principais componentes dos tecidos duros dentais. Dentre todos os lasers situados neste espectro, o Er:YAG é o que tem maior absorção por água em decorrência do seu comprimento de onda coincidir com o pico de absorção da água. O coeficiente de absorção do laser Er:YAG pela água é teoricamente 10.000 vezes maior que o do laser CO₂ e, de 15.000 a 20.000 vezes maior que o do laser Nd:YAG (HALE; QUERRY, 1973). Da mesma forma, o grupo hidroxila (componente da hidroxiapatita) é altamente absorvido pela radiação com laser Er:YAG por possuir o pico de absorção em torno de 2,8 μm (FEATHERSTONE, 2000).

Hibst e Keller (1989) realizaram os primeiros estudos sobre os efeitos do laser de Er:YAG em tecidos duros dentais, por meio da microscopia eletrônica de varredura. Verificaram que o laser Er:YAG promoveu uma remoção efetiva de esmalte e dentina. Neste estudo os autores elucidaram o mecanismo de ablação do laser Er:YAG. Por emitir um comprimento de onda de 2,94 μm , ele apresenta grande absorção pela água e hidroxiapatita e, conseqüentemente, quando aplicado nos tecidos duros dentais, esmalte e dentina, é fortemente absorvido por estes. A ação do laser Er:YAG aparentemente resulta da energia radiante absorvida pela água do tecido alvo, e o aquecimento de fervura, por sua vez, produz vapor de água. Este

vapor aumenta a pressão do meio, até ocorrer uma micro-explosão e, assim, uma pequena parte do tecido é ablacionada.

Kayano *et al.* (1991), estudando os efeitos do laser Er:YAG em dentes humanos extraídos, apresentaram, como explicação para sua excelente efetividade de ablação, livre de danos térmicos, o fato do efeito de vaporização ser muito forte neste comprimento de onda (2,94 μm), pois este é amplamente absorvido pela água presente nos tecidos. O calor gerado é absorvido instantaneamente, razão pela qual os danos térmicos nas áreas adjacentes são mínimos.

Tanji, Matsumoto e Eduardo (1997) investigaram o aspecto da superfície dentinária condicionada com o laser Er:YAG após análise com microscopia eletrônica de varredura. Os autores verificaram a abertura dos canalículos dentinários e a criação de um padrão micro-retentivo, que sugeria uma melhor retenção de materiais restauradores.

Os primeiros estudos sobre os efeitos da irradiação com o laser Er:YAG nas paredes dos canais radiculares, tanto removendo sujidades como o *smear layer*, iniciaram-se no final dos anos noventa.

A partir de então, vários experimentos têm sido realizados avaliando a ação dos lasers como coadjuvantes no tratamento endodôntico em diferentes situações: diagnóstico pulpar, hipersensibilidade dentinária, capeamento pulpar e pulpotomia, esterilização dos canais radiculares, modificação das paredes dos canais radiculares (aumentando ou diminuindo a permeabilidade dentinária), preparo dos canais radiculares, obturação dos canais radiculares e apicectomias (KIMURA; WILDER-SMITH; MATSUMOTO, 2000).

Takeda et al. (1998), por meio da microscopia eletrônica de varredura, avaliaram a capacidade de remoção da camada de *smear layer* aplicando a radiação

com laser Er:YAG após a instrumentação dos canais radiculares. Os parâmetros utilizados foram: energia de pulso de 100 mJ, frequência de 10 Hz, tempo total de exposição de 15 s e com potências de 1W e 2 W. Os resultados evidenciaram que o grupo que não foi irradiado (controle) apresentou-se com grande quantidade de debris e *smear layer* obstruindo os canalículos dentinários em todos os níveis do canal radicular. Os espécimes irradiados com laser apresentaram-se livres da camada de *smear layer*, sem debris e com os canalículos dentinários abertos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos irradiados com 1W e com 2W de potência. Os autores concluíram que o laser Er:YAG foi eficiente na limpeza das paredes dos canais radiculares.

Diversos estudos na área de microbiologia bucal comprovam a eficácia da utilização da radiação laser como coadjuvante no auxílio da eliminação de agentes patológicos. Dependendo da área a ser irradiada, há comprimentos de ondas específicos, relacionados à interação luz–tecido alvo (EDUARDO; PELINO; HAYPEK, 2001; EDUARDO; GOUW-SOARES; HAYPEK, 2002; MALDONADO; RIBEIRO, ZECELL, 2000).

A radiação laser corretamente absorvida no tecido pode reduzir a quantidade de microrganismos, através da elevação da temperatura. Dependendo do agente agressor, uma temperatura em torno de 45⁰C já pode causar danos na membrana citoplasmática do microrganismo. A ação da luz laser sobre a destruição de endotoxinas na intimidade tecidual também é um fator de elevada importância, favorecendo a eliminação do foco infeccioso (ANTENUCCI, 2000).

Yamaguchi et al. (1997) analisaram, por meio de MEV, os efeitos da irradiação com laser Er:YAG em superfícies radiculares de pré- molares extraídos e a capacidade deste laser na remoção de lipossacarídeos. Os autores verificaram

que os lipossacarídeos presentes na parede celular de bactérias gram negativas têm um pico de absorção em torno de 2,940 μm , que corresponde ao comprimento de onda do laser Er:YAG. Os autores constataram, ainda, que o laser Er:YAG com 100 mJ/pulso e 10 Hz de frequência (35.4 mJ/cm²) mostrou ser rápido e efetivo na remoção da maioria dos lipossacarídeos presentes nas superfícies radiculares.

Estudos têm comprovado a capacidade antimicrobiana quando da aplicação da radiação laser sobre a microbiota do sistema de canais radiculares (BERKITTEN; BERKITTEN; OKAR, 2000; GUTKNECHT et al., 1996; MORITZ et al., 1997a). A redução bacteriana é obtida, principalmente, pelo aumento de temperatura no local irradiado. Assim como, a remoção de debris pela irradiação laser contribui para reduzir a quantidade de bactéria no canal radicular.

Moritz et al. (1999) analisaram *in vitro* o efeito dos lasers de Nd:YAG, Ho:YAG e Er:YAG em canais radiculares contaminados. Quarenta dentes instrumentados receberam a suspensão de *Escherichia coli* e *E. faecalis* e, em seguida, foram divididos em seis grupos de cinco dentes e um grupo-controle de dez dentes. Os canais foram irradiados nos mesmos parâmetros para os três tipos de laser: potências médias de 0,8 e 1,5 W e frequência de 10 Hz para ambas. O tempo de exposição foi de cinco ciclos de 5s cada, com um intervalo de 20s entre eles. Todos os lasers testados foram capazes de reduzir substancialmente a população bacteriana, com apenas mínimas diferenças em sua capacidade bactericida. No parâmetro de 1,5 W, 10 Hz, para o laser de Er:YAG, obtiveram-se os melhores resultados quanto à redução microbiana (99,64%), seguidos do laser de Nd:YAG (99,16%) e do laser de Ho:YAG (99,05%).

Como se sabe, a redução microbiana é obtida, principalmente, pelo aumento de temperatura. Entretanto, se a elevação térmica for igual ou superior a

10° C, podem ocorrer danos aos tecidos perirradiculares (ERIKSSON; ALBREKTSSON, 1983).

Cecchini et al. (1999) investigaram a possibilidade de se determinar parâmetros seguros para a utilização dos lasers de Nd:YAG e Er:YAG no interior dos canais radiculares. Foram utilizados 60 dentes unirradiculares extraídos. Após a instrumentação dos canais radiculares até o diâmetro 45, os espécimes foram irradiados com laser Nd:YAG com 60 mJ e 100 mJ, 10 e 15 Hz, tempo de aplicação de 8 a 12 s, fibra óptica de 300 µm e com laser Er:YAG com 40 e 80 mJ, 10 Hz, com mesmo tempo de aplicação, com fibra óptica de 375 µm. As fibras ópticas nos dois tipos de lasers foram aplicadas com movimentos circulares e com velocidade de 2 mm/s. Os resultados obtidos evidenciaram que o aumento da temperatura detectada na superfície externa das raízes, durante a aplicação dos lasers, não ultrapassava valores de 5° C quando as fibras eram utilizadas com movimentos circulares na velocidade estabelecida. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que a irradiação dos canais radiculares com o laser de Er:YAG, nos parâmetros estudados, promovia uma superfície dentinária livre de debris e *smear layer* e com um grande número de canalículos dentinários abertos. Os canais radiculares irradiados com laser Nd:YAG apresentaram paredes limpas, com derretimento e recristalização da dentina e livres de *smear layer*.

Estudos recentes têm analisado a associação da irradiação laser com substâncias químicas de uso endodôntico. Pécora et al. (2000) e Brugnera Júnior (2001) observaram que a utilização do laser de Er:YAG, no interior de canais radiculares repletos de água destilada deionizada, promoveu um aumento na evidência da permeabilidade dentinária e em maior grau do que o uso de hipoclorito de sódio a 1% em associação com esse tipo de laser. Esses autores

salientaram que os diferentes meios líquidos (soluções) fazem com que a radiação laser tenha scattering (espalhamento) diferente e atinja o tecido com intensidade alterada, além de promoverem absorções diferentes. Desta forma, é importante verificar que as soluções irrigantes empregadas no tratamento endodôntico interagem de modos diferentes com o laser Er:YAG.

Raldi e Lage-Marques (2003) avaliaram *in vitro* os efeitos da interação entre soluções irrigantes desmineralizadoras (EDTA-T e ácido cítrico), medicação intracanal (NDP) e laser Er:YAG na permeabilidade dentinária. Foram utilizados 51 dentes unirradiculares extraídos que, após o preparo químico-cirúrgico, foram divididos em sete grupos experimentais: grupos I e II - irrigação final com solução de EDTA-T e ácido cítrico, respectivamente; grupos III e IV - irrigação final com EDTA-T e ácido cítrico, respectivamente, mais a associação entre solução irrigante e laser Er:YAG; grupos V e VI - irrigação final com EDTA-T e ácido cítrico, respectivamente, mais a associação entre medicação intracanal e laser Er:YAG, e grupo VII (controle) - irrigação final com água destilada. Os canais radiculares foram preenchidos com o corante rodamina B solubilizado na medicação de uso intracanal NDP. Após o período experimental, as amostras foram cortadas transversalmente para posterior leitura com o software ImageLab. A análise dos resultados permitiu concluir que existiram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) quanto à penetração da solução corante-medicação intracanal nos diferentes grupos. Os grupos III e IV apresentaram menores valores de permeabilidade dentinária quando comparados aos outros e, finalmente, os melhores resultados foram obtidos quando da interação entre a solução irrigante desmineralizadora e a associação medicação intracanal/laser Er:YAG (grupos V e VI). Nesses últimos, constatou-se que a

diferença de penetração da solução corante-medicação intracanal no terço apical foi, em média, 29% maior do que nos demais grupos.

2.2.3 Laser de Diodo

Os lasers semicondutores, também conhecidos como lasers de diodo, tornaram-se últimas décadas os mais importantes lasers em termos econômicos; são pequenos e têm sido utilizados em uma vasta área de aplicações, desde artigos de eletrônica, como os *cd-players*, às aplicações em comunicações por fibras ópticas.

Os lasers de diodo foram introduzidos logo após a descoberta dos LEDs (Light Emitting Diode) no início da década de 60. Os primeiros lasers de diodo eram de arsenato de gálio que operavam em modo pulsado e, logo após surgiram lasers operando em regime contínuo.

As principais características que o diferem dos demais lasers são: pequeno tamanho; corrente de bombeio baixa (entre 15 e 100 mA); alta eficiência em converter energia elétrica em luz (excede 50%, alguns lasers apresentam no máximo 3% do rendimento), tecnologia de manufatura dos semicondutores (permite sua produção em massa) e a região de 1300 a 1500 nm (possui as menores perdas para as fibras ópticas de sílica).

A aplicação do laser de diodo na odontologia é recente. A tecnologia dos semicondutores tornou-os práticos e portáteis para o uso na clínica diária. Os equipamentos de diodo foram desenvolvidos de acordo com considerações

econômicas e ergonômicas, resultando em custos reduzidos em comparação a outros equipamentos lasers (ROMANOS; NENTWIG, 1999).

O laser de diodo é constituído por um meio ativo sólido, formado por um semicondutor que, freqüentemente, utiliza uma combinação de gálio, arsênio e outros elementos, tais como o alumínio e índio, para transformar energia elétrica em energia luminosa.

Os equipamentos de lasers de diodo de alta potência operam com potências que variam entre 1W a 15 W e apresentam o seu comprimento de onda final determinado de acordo com as características da constituição do semicondutor. Geralmente estão compreendidos em comprimentos de onda que variam desde o visível (0,4 μm) até a faixa do infravermelho próximo não ionizante (+/- 0,9 μm) do espectro eletromagnético (MALDONADO; RIBEIRO; ZECELL, 2000). O comprimento de onda destes lasers para utilização na Odontologia varia entre 800 nm a 980 nm.

O sistema de entrega do feixe é por meio de fibra óptica cujos diâmetros podem variar entre 200, 300 e 600 μm segundo o fabricante. Eles podem ser emitidos em modo contínuo ou interrompidos, de acordo com a indicação clínica, e em modo contato ou não contato com o tecido alvo.

Os parâmetros de um feixe de diodo podem ser regulados pelo tempo útil de emissão e o regime de operação pode ser do modo pulsado ou contínuo.

Todos os comprimentos de onda dos lasers de diodo são altamente absorvidos por tecidos pigmentados (hemoglobina e melanina). Entretanto, a luz laser com comprimento de onda entre 800–980 nm é fracamente absorvida por água (AOKI et al., 2004; MALDONADO; RIBEIRO; ZECELL, 2000; RESEARCH, SCIENCE AND THERAPY COMMITTEE OF THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2002).

Em decorrência do quanto acima exposto, os lasers de diodo são considerados excelentes para procedimentos cirúrgicos de tecidos moles e têm sido indicados para cortes tecidos moles (gengiva e mucosa oral), para obter a coagulação em procedimentos cirúrgicos com excessivo sangramento, bem como para a curetagem de tecidos moles (ROMANOS; NENTWIG, 1999).

Ainda são poucos os trabalhos relatados na literatura avaliando as alterações estruturais provocadas pelo laser de diodo de alta potência nos tecidos duros dentais e superfícies radiculares (KREISLER et al., 2001; KREISLER et al., 2002; THEODORO et al., 2003).

Tem se constatado que este laser, assim como o laser Nd:YAG, quando aplicado nos tecidos duros dentais (esmalte e dentina), provoca a fusão e ressolidificação, sendo capaz de produzir uma superfície mais resistente à ação de ácidos, podendo essa alternativa terapêutica auxiliar na prevenção de cárie (QUINTO JR, 2001).

As alterações geradas pela radiação laser sobre os tecidos duros são dependentes da distribuição da energia entregue e da variação da temperatura durante a irradiação (Mc NALLY; GILLING; DAWES, 1997).

Os estudos até então encontrados na literatura têm evidenciado que o laser de diodo deve ser utilizado com muita prudência nas superfícies radiculares, para que parâmetros inadequados não provoquem danos térmicos indesejáveis, tais como carbonização e danos pulpares.

Kreisler et al. (2001) demonstraram que o laser de Diodo-GaAlAs (809 nm) no modo contínuo de operação com uma fibra óptica de 600 µm de diâmetro com 0,5 mm de distância dos espécimes, nos ângulos de 10° e 90°, com tempos de exposição de 10, 20 e 30 segundos com o tecido, pode promover danos térmicos na

superfície radicular, quando irradiado com as potências de 1,5, 2,0 e 2,5 W, resultando em parcial ou total carbonização dos espécimes irradiados e, ainda, que o ângulo de irradiação tem efeito significativo no dano da superfície radicular. Por outro lado, quando utilizaram as potências de 0,5 e 1,0 W não observaram nenhum dano térmico na superfície radicular, como carbonização.

Gulin (2003) avaliou a alteração morfológica da superfície cementária irradiada com laser de diodo de 808 + ou – 10 nm, aferindo também a variação de temperatura durante a irradiação com potências de 1,0 W; 1,2 W; 1,4 W e 1,5 W. A irradiação foi realizada no sentidoápico-cervical e mésio-distal por duas vezes durante 10 segundos com intervalos de 20 segundos entre uma irradiação e outra, no modo contínuo, com a fibra em contato formando um ângulo de 5° com a superfície cementária. Os resultados de variação de temperatura demonstraram que houve um aumento de temperatura superior a 5,5° C. A análise da morfologia mostrou que no grupo controle houve a formação de *smear layer*, as amostras irradiadas com 1 W de potência apresentaram maior lisura e homogeneidade da superfície radicular, e os grupos irradiados com 1,2 W, 1,4 W e 1,6 W apresentaram ranhuras evidentes intercaladas com áreas lisas homogêneas, com menos *smear-layer* quando comparada com os grupos controle. O autor sugeriu a necessidade de novos estudos para avaliar o laser de diodo no modo interrompido de irradiação.

No mesmo ano, Theodoro et al. (2003) analisaram *in vitro* os efeitos térmicos dos lasers Er:YAG (100 mJ/10 Hz) e do laser de diodo utilizado (1.0 W e 2W de potência), quando aplicados em superfícies radiculares por um período de 30 segundos no modo interrompido (0,05 ms). Foi verificado nas eletromicrografias que não ocorreram alterações morfológicas tais como carbonização, derretimento, crateras ou fusão do cimento. Entretanto, nas amostras irradiadas com laser de

Er:YAG, as superfícies demonstraram-se mais irregulares e mais pronunciadas quando comparadas com as irradiadas com o laser de diodo. Por fim, os autores concluíram que a aplicação dos lasers Er:YAG e de diodo nos parâmetros utilizados não provocaram aumento indesejáveis da temperatura intrapulpar.

Devido ao seu comprimento de onda ser fracamente absorvido pela água e por hidroxiapatita, trabalhos na literatura têm preconizado a irradiação dos tecidos dentais e superfícies radiculares com laser de diodo, principalmente para promover a redução bacteriana.

Moritz et al. (1997b) avaliaram *in vitro* os efeitos do laser de diodo (810 nm, 4 W, modo pulsado / 5 segundos) na redução bacteriana de 44 condutos radiculares contaminados com *Escherichia coli* e *Streptococcus faecalis*. Os autores verificaram que não houve crescimento bacteriano em nenhum dos espécimes avaliados. Neste estudo, também foi observado, por meio de infiltração de corante e da análise em MEV, que houve fechamento completo dos túbulos dentinários das paredes dos canais radiculares irradiados.

Outros estudos têm comprovado o efeito antimicrobiano do laser de diodo de alta potência quando aplicado nas paredes de canais radiculares infectados. Este laser tem sido considerado um instrumento útil na desinfecção de canais contaminados quando comparado com os resultados da técnica endodôntica convencional (KREISLER et al., 2003; RADAELLI, 2002).

Cabe ressaltar o estudo de Gutknecht et al. (2004) no qual os autores verificaram o efeito bactericida do laser de diodo em 102 fragmentos de dentina radicular bovina com diferentes espessuras (100 µm, 300 µm e 500 µm). Os fragmentos foram contaminados com *enterococcus faecalis* e foram irradiados com diferentes parâmetros de potência (1.75 W, 2.3 W e 2.8 W). Os autores verificaram

que nos fragmentos com 100 μm de espessura houve redução de 95% das bactérias quando se utilizou 1,75W de potência, 96% com 2,3 W e 97% com 2,8W. Nos fragmentos com 300 μm de espessura houve redução de 77% das bactérias quando se utilizou 1,75W de potência, 87% com 2,3 W e 89% com 2,8 W e nos fragmentos com 500 μm de espessura houve redução de 57% das bactérias quando se utilizou 1,75 W de potência, 66% com 2,3 W e 86% com 2,8 W. Os autores concluíram que a utilização do laser de diodo de alta potência pode eliminar microrganismos que migraram para o interior dos túbulos dentinários dos condutos radiculares, aumentando o sucesso da terapia endodôntica.

2.2.4 Tratamento das superfícies radiculares com radiação laser

O tratamento das superfícies radiculares por meio de substâncias químicas já foi abordado na primeira parte deste capítulo. E como foi dito, estudos recentes têm preconizado a irradiação das superfícies radiculares com lasers de alta potência para os mesmos fins. Ou seja, para promover alterações estruturais e/ou a descontaminação da superfície radicular comprometida, o que favorece a adesão de fibras e células do tecido conjuntivo e a neoformação de cimento. Estes fatores são fundamentais para que ocorra o processo de regeneração do ligamento periodontal (RIPAMONTI; REDDI, 1997).

A partir da década de noventa, vários estudos, em especial na área da periodontia, foram realizados para analisar o efeito de diversos tipos de lasers de alta potência em superfícies radiculares.

Um dos primeiros trabalhos que analisaram os efeitos da biocompatibilidade das superfícies irradiadas pelos lasers de alta intensidade, por meio do processo de adesão celular, foi o de Thomas et al. (1994), no qual os autores verificaram *in vitro* os efeitos do laser de Nd:YAG na adesão fibroblástica em superfícies radiculares. Os espécimes foram divididos em 4 grupos: controle, laser somente, laser associado ao aplainamento radicular manual e laser associado ao jato abrasivo. O laser foi aplicado no modo contato, com energia de 75 mJ, e frequência de 20 Hz e utilizou-se uma fibra óptica de 320 μ m de diâmetro. Os autores observaram que houve diminuição da adesão fibroblástica no grupo tratado apenas com laser o que evidencia que o laser de Nd:YAG, tem um potencial de tornar o cimento radicular incompatível biologicamente.

No mesmo ano, Tewfik et al. (1994) estudaram, por meio de MEV e adesão celular, os efeitos do laser Nd:YAG com diferentes níveis de energia (fibra óptica com distâncias de: 1 mm, 3 mm e 5 mm), em superfícies radiculares de 15 dentes extraídos. Na análise por meio de microscopia eletrônica de varredura, os autores observaram nas amostras que foram irradiadas com maior nível de energia a formação de crateras e de fissuras sobre a superfície cementária irradiada, enquanto que, com baixos níveis de energia, ocorreu aparente fusão de *smear layer*. Na análise de cultura de fibroblastos, os autores verificaram que, com a utilização de níveis médios de energia (3mm), ocorreu uma diminuição na adesão celular entretanto, não significativa quando comparada ao grupo controle. Em contrapartida, no grupo irradiado com níveis maiores de energia (1mm) ocorreu uma diminuição significativa da adesão fibroblástica. Os autores concluíram que a modificação na biocompatibilidade de superfícies cementárias irradiadas com laser de Nd:YAG, depende do nível de energia aplicada.

Friedman et al. (1998) testaram a hipótese de que uma modificação na superfície radicular, por meio da utilização de laser Nd:YAG, poderia inibir a reabsorção inflamatória. Os autores induziram a reabsorção inflamatória utilizando seis pré-molares inferiores de dois cães e, então, realizaram tratamento com o laser. Dois dentes em cada animal serviram como controle, não sendo induzida a reabsorção inflamatória. Após dez semanas, os animais foram sacrificados e foi realizada a análise histológica. Não foram observadas diferenças entre o grupo irradiado e o não irradiado, sendo constatada, com frequência, a presença de reabsorção inflamatória em ambos os grupos. Os resultados rejeitam a hipótese de que a modificação da superfície radicular com laser Nd:YAG poderia inibir a reabsorção inflamatória.

Schoop et al. (2001) utilizando fibroblastos originados de ratos para análise da adesão celular, verificaram que o laser de Er:YAG utilizado nos parâmetros de 100 mJ/15 Hz (5,98 J/cm²), com a fibra óptica posicionada com angulação de 45° em relação à superfície irradiada e tempo de exposição de 25 segundos (5 irradiações de 5 s e intervalos de 15 s de duração entre as irradiações), combinado ou não à raspagem e ao aplainamento radicular, ofereceu melhores condições de aderência de fibroblastos, do que as superfícies radiculares tratadas apenas com raspagem e aplainamento radicular.

No ano seguinte, Feist (2002) verificou a adesão e a proliferação de fibroblastos de gengiva humana sobre superfícies radiculares irradiadas com laser de Er:YAG ou instrumento manual. A autora observou que houve um aumento significativo na adesão e na proliferação fibroblástica em superfícies irradiadas com laser de Er:YAG com 35 mJ /10 Hz/ 3 J/cm² (2 aplicações de 10 segundos), quando

comparado ao grupo que não foi irradiado com laser e ao irradiado com o mesmo laser, mas com 59 mJ/10 Hz/ 5 J/cm².

Poucos são os trabalhos na literatura com relação à adesão celular em superfícies irradiadas com laser de diodo.

Kreisler et al. (2001) analisaram *in vitro* o efeito do tratamento de superfície radicular com o laser de Diodo GaAlAs (810 nm) na adesão de células do ligamento periodontal, por meio de microscopia eletrônica de varredura. Foram utilizados espécimes, obtidos de superfícies radiculares de dentes extraídos por doença periodontal. Cento e cinquenta espécimes de raízes foram inicialmente raspados e aplainados com curetas manuais seguida de tratamento com jato de ar abrasivo. A seguir, 75 espécimes foram irradiados com laser e 75 não sofreram nenhum tratamento (controle). O laser foi aplicado em forma de varredura, perpendicularmente e à uma distância de 0,5 mm dos espécimes, em modo contínuo, com potência de 1,0 W. Utilizou-se uma fibra de 600 μ m, durante 20 segundos. Não houve diferenças estatisticamente significantes na densidade de células do ligamento periodontal sobre as superfícies, entre os grupos. Diante dos resultados, os autores concluíram que a irradiação de raízes com laser de diodo nos parâmetros utilizados, não promoveu efeitos adversos na adesão celular, porém, sugerem que novos estudos devam ser realizados para analisar a indicação deste laser na descontaminação de bolsas periodontais, já que ainda se mantém questionável o fato deste tratamento promover benefícios na formação de um novo tecido conjuntivo.

Theodoro (2003) avaliou *in vitro* a adesão de elementos sanguíneos sobre superfícies radiculares irradiadas com laser de Er:YAG e de diodo, e a ação destes sobre as superfícies radiculares. Foram obtidas 120 amostras de dentes humanos

extraídos por doença periodontal, que foram previamente raspados e aplainados com instrumentos manuais, sendo, a seguir, divididos aleatoriamente em 6 grupos com 20 amostras cada. O G1 (controle) - não recebeu nenhum tratamento; o G2 - recebeu aplicação tópica de EDTA 24%; o G3 - foi irradiado com laser de Er:YAG com 7,6 J/cm²; o G4 - foi irradiado com laser de Er:YAG com 12,9 J/cm²; o G5 - foi irradiado com laser de diodo com 90 J/cm² e o G6 - foi irradiado com laser de diodo com 108 J/cm². Após a realização dos tratamentos, em 10 amostras de cada grupo foi depositado, imediatamente à sua punção, tecido sanguíneo originado da vascularização periférica de sangue humano, sendo que 10 amostras não receberam tal tratamento. As fotomicrografias obtidas foram avaliadas por meio de dois índices: adesão de elementos sanguíneos e de morfologia da superfície radicular. Diante dos resultados obtidos, o autor conclui que: (i)- nenhum tratamento proposto aumentou a adesão de elementos sanguíneos de forma significativa quando comparado ao controle; (ii) - o EDTA inibiu a adesão do tecido sanguíneo; (iii)- o laser de Er:YAG (12,9 J/cm²) foi mais efetivo que o diodo (90 J/cm²) na adesão e, independentemente do parâmetro, promoveu alterações na morfologia das superfícies radiculares irradiadas, como microrugosidades e (iv) - o laser de diodo, dependendo do parâmetro utilizado, pode inibir a adesão.

Haypek (2005) verificou *in vitro* a interação entre o laser de diodo de alta potência e a superfície radicular, por meio da análise de variação de temperatura, morfologia superficial das raízes dentárias e análise de adesão e a proliferação de fibroblastos cultivados sobre estas superfícies (em 24 h – adesão; 48 e 72 h - proliferação). Neste estudo foram utilizados 21 dentes unirradiculares os quais foram divididos em 3 grupos experimentais: Grupo controle - só recebeu o tratamento inicial de raspagem e alisamento radicular; Grupo INT - recebeu o mesmo

tratamento do controle seguido de irradiação com o laser de diodo de alta potência, com comprimento de onda de 808 nm e fibra óptica de 400 µm de diâmetro, posicionada paralelamente à superfície radicular no parâmetro de 1,5 W (597,1 W/cm² na ponta da fibra) durante 30 s no modo interrompido; e Grupo CW - no qual foi utilizado o mesmo tratamento do grupo INT, porém, com o laser no modo contínuo. A monitoração de temperatura demonstrou que, com os parâmetros utilizados, houve aumento de temperatura dentro dos limites biocompatíveis, bem como que esse aumento foi significativamente maior no grupo CW. Nos grupos irradiados, observou-se presença de *smear-layer* modificada, exibindo uma superfície com áreas de aspecto mais liso correspondendo às áreas de fusão e ressolidificação, entremeadas por zonas de aspecto mais corrugado. Túbulos dentinários abertos não foram observados. Os fibroblastos plaqueados sobre as superfícies irradiadas aderiram e aumentaram em número no decorrer do tempo experimental. As curvas de crescimento celular sobre as superfícies irradiadas com os dois modos do laser apresentaram comportamento biológico similar entre si e entre o grupo controle. O autor concluiu que, nas condições deste estudo, o uso do laser de diodo de alta potência é seguro do ponto de vista térmico e causa alterações morfológicas superficiais similares, independentemente dos modos de irradiação. Adicionalmente, essas superfícies radiculares irradiadas são biocompatíveis, possibilitando a adesão e a proliferação celular.

Raldi et al. (2006) avaliaram o efeito da irradiação com laser Er:YAG e laser de diodo de alta potência, na adesão celular, quando aplicada em reabsorções radiculares externas simuladas. Foram utilizados 9 dentes humanos, recém extraídos, que após a realização de cavidades na superfície externa da dentina radicular, foram divididos em 3 grupos experimentais: o grupo I recebeu irradiação

com laser de diodo de alta potência (potência na saída da fibra de 1 W, tempo de 10 s, fibra óptica de 300 μm e intensidade de potência de 796 W/cm^2); o grupo II recebeu irradiação com laser Er:YAG (energia no monitor de 60mJ e de saída de 25,2 mJ, frequência de 10 Hz, tempo de 10 s, fibra óptica de 375 μm e fluência na ponta da fibra de 228 J/cm^2) e o grupo III (controle) não foi irradiado. Os resultados mostraram que a adesão celular foi em ordem decrescente: Grupo I > Grupo II > Grupo III. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos irradiados com laser e o grupo controle. Os autores concluíram que a aplicação da irradiação com laser de diodo de alta potência e com laser Er:YAG, em superfícies dentinárias expostas, favoreceu a adesão celular.

Diante do exposto neste capítulo, é pertinente a realização de estudos, no sentido de buscar alternativas de tratamento para as reabsorções radiculares externas. E dentre as várias metodologias a serem empregadas, a análise da adesão celular é um bom indicador para avaliar a biocompatibilidade de novas propostas terapêuticas.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar, por meio de cultivo celular e MEV, a capacidade de adesão de fibroblastos e as alterações morfológicas ocorridas em cavidades simulando reabsorções radiculares externas, após irradiação da superfície dentinária com os lasers de diodo e Er:YAG e tratamento com materiais de uso endodôntico (hidróxido de cálcio e MTA) seguido ou não de irradiação com os lasers de alta potência.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

- Azul de Trypan a 0,4% (Sigma Aldrich Brasil - São Paulo - SP);
- Brocas de alta rotação de ponta diamantada em forma de disco FG 3059 (Microdont, São Paulo - SP);
- Centrífuga Excelsa Baby I, modelo 206 (Fanem, SP);
- Câmara de Neubauer (Baxter);
- Cultura de células (linhagem celular FMM1) - fragmento de gengiva humana (Banco de Células do Departamento de Dentística Restauradora da FOUSP);
- Dimetil-sulfóxido - DMSO (Sigma Chemical, CO - St. Louis, MO, USA);
- Disco de diamante EXTEC Diamond Wafering Blade, XL 12205, EXCEL Technologies Inc., Connecticut, USA;
- Hidróxido de cálcio P.A (Farmácia Fórmula & Ação, São Paulo - SP);
- Hipoclorito de sódio 1% (Farmácia Fórmula & Ação, São Paulo - SP);
- Laser de diodo de alta potência (Softlase - Zap Lasers - EUA) do Laboratório Experimental de Laser em Odontologia (LELO) do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - SP;
- Laser Er:YAG (KaVo Key Laser 2, Germany - Laboratório Experimental de Laser em Odontologia (LELO) do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - SP);
- Laser power meter - Power Max 600 (Molelectron, Portland, Oregon - EUA).
- Meio de cultura celular de Eagle modificado por Dulbecco - DMEM (Sigma

Chemical, CO - St. Louis, MO, USA);

- Microscópio eletrônico de varredura Leo 435 VPi (Leo Ltda, Cambridge, UK);
- Microscópio invertido de fase (Axiovert 25 ZEISS);
- MTA Branco (Angelus, Londrina, PR);
- Programa estatístico GraphPad InStat Versão 3.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA);
- Programa ImageLab 2.3 (software desenvolvido pelo laboratório de informática dedicado à disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP);
- Raios Gama – Fonte tipo Gammacell (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- IPEN ,Universidade de São Paulo -SP);
- Solução antibiótica/antimicótica (Sigma Aldrich Brasil - São Paulo -SP);
- Solução salina tamponada com fosfato - PBS;
- Solução salina tamponada com fosfato, sem cálcio e sem magnésio - PBSA;
- Solução de tripsina 0,25% (Sigma Aldrich Brasil - São Paulo -SP);
- Soro fetal bovino (Sigma Aldrich Brasil - São Paulo -SP);
- 31(trinta e um) dentes unirradiculares extraídos (cedidos pela Disciplina de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da UNESP).

4.2 Metodologia experimental

4.2.1 Obtenção dos espécimes

Foram selecionados 31 (trinta e um) dentes unirradiculares de uma amostra de dentes recém-extraídos pelos alunos do 3º ano do curso de graduação em Odontologia, da disciplina de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, sendo devidamente adotados os critérios relativos às normas de bioética³.

Os dentes foram lavados em água corrente e escovados para melhor limpeza. Em seguida, foram autoclavados e mantidos em solução de PBS em geladeira, à temperatura de 2°C, até o início do experimento.

4.2.2 Preparo das amostras

Os dentes foram seccionados na forma transversal, no limite coroa-raiz, as coroas foram desprezadas e as raízes clivadas no sentido longitudinal, obtendo-se duas hemisecções.

Cavidades, simulando reabsorções radiculares externas, foram realizadas no terço cervical, previamente demarcadas com lápis, entre 1mm e 7mm da junção esmalte-cimento de cada hemisecção. Foi realizada, ainda, 1 (uma) cavidade em cada hemisecção (Figura 4.1).

³Este trabalho teve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo A).

Figura 4.1- Preparo das hemisecções e demarcação da cavidade que simulará a reabsorção radicular externa

Para a padronização das reabsorções simuladas foi desenvolvido um dispositivo que permitiu a fixação da caneta de alta rotação, da broca e dos dentes. Desta forma, com pontas diamantadas em forma de disco FG 3059, foram obtidas cavidades com a mesma profundidade e diâmetro da broca, ou seja, 0,5 mm de profundidade por 3 mm de diâmetro (Figura 4.2 - A, B, C, D).

Em seguida, as hemisecções, com as respectivas cavidades, foram preparadas de forma a obter fragmentos de, aproximadamente, 6mm X 5mm. Para tanto, utilizaram-se discos diamantados dupla face. (Figura 4.2 - F).

Posteriormente, os fragmentos foram irrigados com 10 (dez) mL de soro fisiológico, para a remoção das “raspas” de dentina.

Figura 4.2- Esquema para a obtenção das amostras: A e B - Broca em forma de disco e dispositivo para controle da profundidade da cavidade; C e D - Dispositivo para padronização das cavidades; E - Realização das cavidades (diâmetro e profundidade iguais ao da broca); F - Aspecto final dos fragmentos - aproximadamente 6mm x 5mm

Durante todo o experimento os espécimes foram mantidos em frascos com solução de PBS e, após cada manipulação, foram autoclavados para evitar possíveis contaminações, que pudessem impedir a adesão dos fibroblastos⁴.

4.2.3 Divisão dos espécimes

As 31 (trinta e uma) raízes originaram 62 (sessenta e duas) amostras que, de acordo com o tratamento realizado, foram divididas em 8 (oito) grupos experimentais com 7 (sete) amostras cada, e um grupo controle, com 6 (seis). Nos grupos experimentais, 4 (quatro) amostras foram utilizadas para a análise da adesão celular e 3 (três) para a análise em MEV. No grupo controle 4 (quatro) amostras foram utilizadas para a análise da adesão e 2 (duas) para a análise em MEV.

Grupo 1 - as reabsorções simuladas foram irradiadas com laser Er:YAG com comprimento de onda de 2,94 μm , energia por pulso de 100 mJ no monitor e 42 mJ na saída da fibra, taxa de repetição (frequência) de 10 Hz. Para a orientação da luz laser foi utilizada uma luz guia com laser Hélio-Neônio de baixa intensidade (comprimento de onda de 632,8 nm). O sistema de entrega foi realizado por uma fibra óptica de 375 μm de espessura e método por contato, resultando em uma fluência calculada de 38 J/cm^2 na ponta da fibra. A irradiação foi realizada com a fibra óptica posicionada em 90° com a cavidade, com movimentos de varredura em toda a sua extensão, durante 5 s. Este procedimento foi repetido duas vezes com o tempo de exposição de 10 s. No momento da irradiação as amostras estavam umedecidas com água destilada. Os demais parâmetros se encontram no Apêndice

⁴ Os espécimes foram armazenados em recipientes de vidro com PBS. A esterilização foi realizada no modo líquido (pressão de 1,2 kg/cm^2 , à temperatura de 135°C, tempo de aquecimento de 11 min e tempo total de 31 min).

A.

Grupo 2 - as reabsorções simuladas foram irradiadas com laser de diodo de alta potência com comprimento de onda de 808 nm, ± 5 nm, em modo contínuo, fibra óptica de quartzo de 400 μ m, feixe de luz guia de diodo vermelho de 650 nm. A potência no monitor foi de 1,2 W e na saída da fibra⁵ de 1,0 W. A intensidade de potência calculada foi de 796 W/cm². A irradiação foi realizada com a fibra óptica a 0,5 mm da cavidade (sem contato), em um ângulo de 90⁰ e com movimento de varredura, em toda a sua extensão, durante 5s. Este procedimento foi repetido duas vezes (tempo de exposição 10 s). Os demais parâmetros se encontram no Apêndice

B.

Grupo 3 - uma pequena quantidade de pasta de hidróxido de cálcio⁶ foi inserida nas cavidades das reabsorções simuladas e friccionada por 5 min. Em seguida, foi realizada a irradiação com laser Er:YAG da mesma forma descrita no grupo 1.

Grupo 4 - uma pequena quantidade de pasta de hidróxido de cálcio foi inserida nas cavidades e friccionada por 5 min. Em seguida, foi realizada a irradiação com laser de diodo da mesma forma descrita no grupo 2.

Grupo 5 - uma pequena quantidade de MTA⁷ foi inserida nas cavidades. Em seguida, foi feita a irradiação com laser Er:YAG da mesma forma descrita no grupo 1.

Grupo 6 - uma pequena quantidade de MTA foi inserida nas cavidades. Em seguida, foi realizada a irradiação com laser de diodo da mesma forma descrita no grupo 2.

Grupo 7 - colocação de pequena quantidade de pasta de hidróxido de

⁵ A potência de saída foi calculada por meio de um aparelho medidor de potência - Power Max 600

⁶ Hidróxido de Cálcio P.A veiculado em soro fisiológico, de modo a obter uma mistura pastosa

⁷ MTA-Angelus - foi manipulado de acordo com fabricante: uma medida de pó/ 1 gota de água destilada

cálcio nas cavidades e fricção por 5 min.

Grupo 8 - colocação de pequena quantidade de MTA nas cavidades.

Grupo 9 - grupo controle - sem tratamento.

Após o término dos diferentes tratamentos propostos, foi realizada a esterilização final das amostras com Raios Gama⁸.

4.2.4 Metodologia para verificação da aderência celular (FEIST, 2002).

- Cultura de células

Neste estudo foram utilizados fibroblastos congelados, obtidos de um fragmento de gengiva humana a partir da linhagem celular FMM1.

As células foram descongeladas rapidamente (30 segundos) em banho-maria (37° C), pois o dimetil-sufóxido (DMSO), solução que mantém a célula congelada viável, é tóxica não devendo permanecer em contato com os fibroblastos descongelados. Logo após, foi realizada a neutralização da solução por meio da aspiração e transferência do conteúdo da ampola para um novo tubo de ensaio contendo 5mL de meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco contendo 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução antibiótica-antimicótica (DMEM fresco). Em seguida, foi feito o processo de centrifugação por 5 minutos, objetivando a obtenção do precipitado de células. Novamente, as células foram cultivadas em meio de cultura DEMEM e mantidas em estufa a 37° C, numa atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂. Após essa etapa, foi realizada a monitorização do crescimento celular, a cada 24 horas, até que se constatasse, por meio de microscópio de fase invertido, que as células tinham atingido a subconfluência (Figura 4.3).

⁸ Fonte tipo Gammacell - taxa de dose: p/mês maio 3,25KGY/h - Dose: 25KGY- Tempo: 07h42min

Figura 4.3 – Esquema representativo de obtenção dos fibroblastos para análise da adesão

É importante salientar que para a manutenção da viabilidade das células, realizou-se a troca dos meios de cultivo dos frascos a cada dois ou três dias.

Uma vez constatado o estado de subconfluência, iniciou-se os subcultivos. O meio dos frascos foi aspirado e a monocamada celular foi lavada duas vezes com solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA), pH 7,2. A seguir, as células foram separadas com 2 mL de uma solução de tripsina 0,25%, durante 2 minutos a 37° C. A tripsina foi inativada com 5 mL de meio de cultura contendo soro fetal bovino. As células em suspensão foram transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas a 300 g, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuspensionado em 1 mL de meio fresco, e a suspensão de células foi, então, replaqueada em novos frascos de cultivo.

▪ Plaqueamento das amostras

Para a verificação da adesão celular, foram plaqueadas as mesmas quantidades de células sobre todos os fragmentos.

Para a determinação do número de células existentes nos frascos originais, foram realizados os seguintes procedimentos: as células que cresceram nos frascos foram separadas por meio de tripsinização e, após a obtenção da suspensão de células, estas foram centrifugadas por 5 minutos (300 g) e o precipitado de células ressuspensionado em 1 mL de PBSA. Parte desta suspensão (0,1 mL) foi transferida para um novo tubo de ensaio, onde foram adicionados 0,8 mL de PBSA e 0,1 mL de azul de Trypan. Em seguida, algumas gotas desta suspensão celular foram transferidas para o hemocitômetro (câmara de Neubauer) e, com um microscópio invertido de fase, foi realizada a contagem celular. As células mortas

foram evidenciadas pela coloração azulada, enquanto as vivas mantiveram-se despigmentadas (Figura 4.4).

Figura 4.4 - Ilustração da metodologia empregada para o cálculo do número de células existentes no frasco, para posterior determinação do nº de fibroblastos plaqueados em cada amostra

As células mortas aparecem coradas em azul, pela penetração do azul de Trypan, devido a lesões na membrana celular. A exclusão destas células da contagem geral serviu para a determinação da viabilidade celular.

O número total de células originárias do frasco foi obtido por meio da seguinte equação matemática:

$$\frac{\text{Número total de células contadas} \times \text{diluição} \times 10^4}{\text{Número de quadrados do hemocitômetro usados para contagem}}$$

Número de quadrados do hemocitômetro usados para contagem

O número total de células viáveis foi obtido por meio da mesma sentença matemática, excluindo-se as células mortas, a saber:

$$\frac{\text{Número total de células não coradas} \times \text{diluição} \times 10^4}{\text{Número de quadrados do hemocitômetro usados para contagem}}$$

Número de quadrados do hemocitômetro usados para contagem

O percentual de viabilidade da população celular foi obtido dividindo-se o número total de células viáveis pelo número total de células e o resultado, multiplicado por 100 (FRESHNEY, 2000).

A partir destes cálculos chegou-se ao número de células plaqueadas em cada amostra, que neste estudo foi de 5×10^4 células por well em 2mL de meio de cultura (Figura 4.5).

Figura 4.5 - Recipiente utilizado para o plaqueamento das 36 amostras (4 amostras/grupo)

- Preparo dos fragmentos para obtenção das eletromicrografias e posterior contagem das células aderidas.

Decorridas 24 horas do plaqueamento, as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato de sódio 0,1 M por 2 horas à temperatura ambiente. A pós-fixação foi realizada por meio da solução de tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão. Em seguida, as amostras foram desidratadas em etanol em série crescente, imersas em hexadimetil disilazona (HMDS) por 30 minutos e secas no ar dentro de capela.

As amostras foram submetidas ao processo de *sputtering*, sendo cobertas com uma camada de ouro de 10 nm. A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em microscópio eletrônico de varredura Leo 435 VPi.

- Contagem de células nas eletromicrografias

Todos os fragmentos foram fotografados no microscópio eletrônico de varredura com distância focal de 20 mm e aumento de 300 X. Foram obtidas eletromicrografias de 3 (três) áreas de cada fragmento: campo superior direito, centro e campo inferior esquerdo, com o objetivo de abranger as mesmas áreas de todos eles (Figura 4.6).

Figura 4.6 - Esquema da obtenção das eletromicrografias para a contagem do n^o de células aderidas, 3 (três áreas) para cada amostra. Totalizando para cada grupo 12 (doze) eletromicrografias

Foi utilizado o programa ImageLab para realização da contagem das células aderidas (Figura 4.7).

Figura 4.7. Programa ImageLab: a - contraste normal b - contraste invertido
➡ Ferramenta utilizada para demarcação e contagem do n^o de células

4.2.5 Análise em MEV

A análise em MEV foi realizada com microscópio eletrônico de varredura Leo 435 VPi. Foram utilizadas 3 (três) amostras por grupo experimental, sendo que 2 (duas) amostras foram avaliadas no sentido transversal e 1(uma) no sentido longitudinal. Para cada amostra foram selecionadas 3 (três) áreas mais representativas: dentina (E1) , centro da cavidade (E2) e limite dentina-cavidade (E3) perfazendo um total de 9 (nove) eletromicrografias/grupo experimental e 6 (seis) para o grupo controle(Figura 4.8).

Foram avaliadas as alterações morfológicas ocorridas na dentina e nos diferentes materiais; aspecto dos túbulos dentinários e a interface dentina-material.

Figura 4.8 - Esquema do preparo das amostras para análise em MEV

4.2.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio do programa estatístico GraphPad InStat Versão 3.0.

A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os valores apresentaram distribuição normal e/ou variâncias homogêneas, deste modo foi utilizado o teste paramétrico ANOVA complementado pelo teste de Tukey. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos pela execução do modelo experimental serão apresentados em dois tópicos separadamente.

No primeiro, será apresentado o resultado da adesão celular realizado por meio da contagem de fibroblastos aderidos nas superfícies tratadas e, no segundo, a análise em MEV das alterações morfológicas ocorridas.

5.1 Adesão celular

Os resultados referentes à análise quantitativa das células aderidas nos diferentes grupos experimentais estão expressos na tabela 5.1 e figura 5.1.

Conforme descrito no capítulo “Material e Métodos”, cada grupo foi constituído por 4 (quatro) amostras (A1,A2,A3,A4), sendo obtidas 3 (três) eletromicrografias (aumento de 300 X) de cada uma delas. Dessa forma, foram obtidas 12 (doze) eletromicrografias por grupo e, conseqüentemente, para a análise do número de fibroblastos aderidos foram realizadas 12 (doze) leituras por grupo.

A quantidade de fibroblastos aderidos nas amostras dos grupos experimentais foi em ordem decrescente: G1>G2>G9>G8>G5>G6>G4>G3>G7.

Como a distribuição do número de células aderidas sobre as amostras nos diversos grupos foi normal, os dados foram analisados com o teste estatístico ANOVA complementado pelo teste de Tukey, com nível de significância 5%. Os resultados da análise estatística estão expressos na tabela 5.2, enquanto que os dados originais estão expressos no apêndice C.

Os grupos irradiados com laser (G1 e G2) apresentaram os melhores resultados em relação à adesão celular (figura 5.2). Nas amostras destes grupos, os fibroblastos apresentaram-se com aspecto estrelário ou fusiforme e com tamanho normal quando comparados aos do grupo controle (figura 5.3 a e b).

O grupo 1 (irradiado com laser Er:YAG) apresentou maior número de células aderidas do que o grupo 2 (irradiado com laser de diodo), havendo diferença estatisticamente significativa entre eles (tabela 5.2)

Nas amostras do grupo 1 foram observadas uma maior quantidade de fibroblastos aderidos justamente nos pontos tocados pela fibra óptica. Nestes locais, as células estavam muito próximas umas das outras, o que dificultou, em algumas eletromicrografias, a contagem e identificação das mesmas (figura 5.4).

O grupo controle (G9), o tratado com MTA (G8) e aqueles em que se associou ao MTA à radiação laser (G5 e G6) apresentaram resultados intermediários. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo G8 e o grupo controle. Entretanto, quando se associou ao material a radiação laser, tanto com Er:YAG, quanto com o diodo, foi observada uma redução no número de células aderidas, com diferença estatisticamente significativa, quando comparados ao grupo controle (figuras 5.5 e 5.6).

O grupo 7, no qual as amostras foram tratadas com hidróxido de cálcio, apresentou os piores resultados. O número de células aderidas variou de 0 a 10. Neste grupo não houve adesão celular na maioria das amostras (figura 5.7).

Entretanto, quando se associou a radiação laser ao material, tanto com Er:YAG quanto com o diodo (G3 e G4), foi observado um aumento na média do número de células aderidas. O grupo 4 (hidróxido de cálcio + diodo) apresentou

maior número de células aderidas quando comparado com os demais grupos tratados com hidróxido de cálcio (G7 e G4) com diferença estatisticamente significativa.

Cabe ressaltar que os grupos em que se associou ao hidróxido de cálcio à radiação laser (G3 e G4) apresentaram resultados heterogêneos, ou seja, em algumas amostras houve adesão celular, enquanto em outras, assim como no grupo G7, não ocorreu adesão de fibroblastos (figuras 5.8 - a e b; 5.9 - a e b).

Por fim, com exceção dos grupos G1 e G2, conforme já descrito anteriormente, observou-se nos demais grupos (G3, G4, G5, G6, G7 e G8), em várias amostras, principalmente naquelas onde o número de fibroblastos aderidos era menor, que estes se apresentaram com tamanho reduzido quando comparados com os dos grupos irradiados (G1 e G2) e com os do grupo controle (figura 5.10 - a e b).

Tabela 5.1 - Número de fibroblastos aderidos nas amostras dos grupos experimentais e médias amostrais de cada grupo

	G1 Er:YAG	G2 Diodo	G3 Ca+Er	G4 Ca+Di	G5 MTA+ Er	G6 MTA+Di	G7 CaOH2	G8 MTA	G9 Control
A1-1	263	196	4	102	123	101	10	120	162
A1-2	264	212	0	82	123	93	4	125	150
A1-3	261	209	0	76	123	92	2	130	148
A2-1	239	195	68	12	128	111	0	125	130
A2-2	259	198	60	0	111	110	3	136	132
A2-3	248	180	45	0	121	111	1	145	145
A3-1	231	235	5	0	97	130	1	131	175
A3-2	201	248	0	0	100	110	0	121	186
A3-3	224	234	0	0	129	90	2	112	191
A4-1	264	205	13	117	138	134	0	149	158
A4-2	259	166	0	102	140	123	0	145	175
A4-3	257	156	6	77	145	121	0	135	184
Média	247,5	202,8	16,8	47,3	123,2	110,5	1,9	131,2	161,3

Figura 5.1 - Desvio padrão e médias do número de fibroblastos aderidos nas amostras dos diferentes grupos experimentais

Quadro 1- Resultado da análise estatística da adesão celular nos grupos experimentais, obtido pelo teste ANOVA e diferença entre as médias do número de fibroblastos aderidos entre os grupos

	G9 Control (161,3)	G8 MTA (131,2)	G7 CaOH ₂ (1,9)	G6 MTA + Diodo	G5 (MTA + Er)=	G4 CaOH ₂ + Diodo	G3 CaOH ₂ + Er	G2 Diodo (202,8)
G1 Er:YAG (247,5)	86,2	116,3	245,6	124,3	200,2	230,2	230,7	44,7
G2 Diodo (202,8)	41,5	71,6	200,9	92,3	79,6	155,5	186	
G3 CaOH ₂ + Er	144,5	114,4	14,9	93,7	106,4	30,5		
G4 CaOH ₂ + Diodo	114	83,9	45,4	63,2	75,9			
G5 (MTA + Er)=	38,1	8	121,3	12,7				
G6 MTA + Diodo	50,8	20,7	108,6					
G7 CaOH ₂ (1,9)	159,4	129,3						
G8 MTA (131,2)	30,1							

■ Significante a 5 % (p< 0,05)

■ Não significante

(Números em verde) - Média do número de fibroblastos aderidos em cada grupo experimental
(Números em branco) - Diferença entre as médias dos fibroblastos aderidos entre os grupos

Figura 5.2 - Amostras da leitura do número de fibroblastos nos grupos onde houve maior adesão celular: a - amostra irradiada com laser Er:YAG (G1); b - amostra irradiada com laser de diodo (G2) ♦ Leitura realizada com o programa ImageLab

Figura 5.3 - Aspecto morfológico dos fibroblastos aderidos nas amostras dos grupos irradiados com laser Er:YAG (a) e laser de diodo (b)

Figura 5.4 - Eletromicrografias da amostra irradiada com laser Er:YAG (G1) evidenciando a adesão de fibroblastos nos locais onde houve contato da fibra óptica com a superfície dentinária
a - aumento 16 X b - aumento 144 X c - aumento 356 X

Figura 5.5 - Amostras da leitura do número de fibroblastos nos grupos onde houve adesão celular intermediária: a - amostras tratadas com MTA (G8); b - grupo controle (G9)

Figura 5.6 - Amostras da leitura do número de fibroblastos nos grupos onde se realizou a associação MTA com radiação laser: a - MTA + Er:YAG (G 5); b - MTA+ Diodo (G6), neste grupo a mudança de contraste (invertido) facilitou a identificação e leitura do número de células aderidas

Figura 5.7 - Amostras da leitura do número de fibroblastos no grupo 7 (pasta de hidróxido de cálcio):
a = A2-1 ; b = A3-2 - não houve adesão celular nestas amostras

Figura 5.8 - Amostras da leitura do número de fibroblastos no grupo G3 (associação CaOH_2 + Er:YAG). Houve diferenças quanto ao número de fibroblastos aderidos nas amostras deste grupo. a - houve adesão celular (68 células) e b - não houve adesão de fibroblastos

Figura 5.9 - Amostras da leitura do número de fibroblastos no grupo G4 (associação CaOH_2 + Diodo). Houve diferenças quanto ao número de fibroblastos aderidos nas amostras deste grupo. a - ocorreu adesão celular e b - não houve adesão de fibroblastos

Figura 5.10 - Eletromicrografias do aspecto morfológico dos fibroblastos aderidos nas amostras do grupo G6 (a): e do grupo controle (b). Grupo G 6 - fibroblastos com tamanho reduzido

5.2 Alterações morfológicas nas superfícies dentinárias e nos materiais de uso endodôntico

Conforme descrito no capítulo “Material e Métodos”, 3 (três) amostras de cada grupo experimental não foram submetidas à análise da adesão e foram preparadas para análise em MEV. Para cada grupo foram obtidas eletromicrografias das regiões mais representativas de 2 (duas) amostras que receberam cortes transversais e de 1 (uma) que recebeu corte longitudinal. Foram observados os aspectos morfológicos da dentina, dos materiais de uso endodôntico e das alterações provocadas em ambos após a irradiação com laser Er:YAG e de diodo.

Para melhor comparação e entendimento dos resultados referentes a tais alterações, eles foram subdivididos em três tópicos: aspectos da superfície dentinária das amostras irradiadas com laser e das amostras sem tratamento (G1, G2 e G9); aspectos morfológicos das amostras tratadas com hidróxido de cálcio associadas ou não à radiação laser (G3, G4 e G7); e aspectos morfológicos das amostras tratadas com MTA associadas ou não à radiação laser (G5, G6 e G8).

5.2.1 Aspectos morfológicos da superfície dentinária das amostras irradiadas com laser e das amostras do grupo controle (G1, G2 e G9)

No grupo G1 (amostras irradiadas com Laser Er:YAG) foram observadas na superfície dentinária: microrugosidades com aspecto de escamas sobrepostas (figura 5.11- a,b) e ausência de *smear layer*. Os túbulos dentinários apresentaram-se

abertos, tanto nos cortes longitudinais como nos transversais (figura 5.11- a, b, c, d, e), e não foram observadas zonas de fusão, tampouco de carbonização.

No grupo G2 (amostras irradiadas com laser de diodo) observou-se que a superfície dentinária irradiada se apresentou irregular e com microrugosidades em algumas amostras (figura 5.12) e em outras foram observadas áreas mais lisas, com aspecto mais homogêneo, sugerindo que houve derretimento e fusão da dentina (figura 5.13 a). Em todas as eletromicrografias avaliadas, os túbulos dentinários estavam obliterados (figuras 5.12, 5.13 a e b). A quantidade de *smear layer* variou nas diferentes amostras, sendo que algumas se apresentaram com maior e outras com menor quantidade (figuras 5.13 a e 5.13 b). Não foram observadas trincas, assim como zonas de carbonização.

No Grupo G9 (grupo controle) a superfície dentinária apresentou-se, em todas as amostras, com grande quantidade de *smear layer* e com os túbulos dentinários obliterados (figura 5.14).

Figura 5.11- Aspecto da superfície dentinária após irradiação com Er:YAG: túbulos dentinários abertos e ausência de *smear layer*. (a,b) - eletromicrografias de amostras que receberam corte transversal; (c, d, e, f) - eletromicrografias de amostras que foram cortadas longitudinalmente

Figura 5.12- Aspecto da superfície dentinária após irradiação com laser de diodo: superfície irregular com os túbulos dentinários fechados (corte transversal)

Figura 5.13- Aspecto da superfície dentinária após irradiação com laser de diodo: a - túbulos dentinários fechados com ausência de *smear layer* b- túbulos dentinários fechados com presença de *smear layer* (cortes transversais)

Figura 5.14- Eletromicrografia do aspecto da superfície dentinária das amostras do grupo controle: túbulos dentinários fechados com grande quantidade de *smear layer* (corte transversal)

5.2.2 Aspectos morfológicos das amostras tratadas com hidróxido de cálcio associadas ou não à radiação laser (G7, G3 e G4)

No grupo 7, no qual as amostras foram tratadas com hidróxido de cálcio, observou-se que o material cobriu toda a superfície dentinária da cavidade e se apresentou com aspecto granuloso e heterogêneo (figura 5.15).

Nos grupos 3 e 4 (hidróxido de cálcio+ radiação laser) foi verificado que o laser Er:YAG, assim como o de diodo, provocaram derretimento e fusão do material (figuras 5.16 e 5.17).

Nos cortes longitudinais das amostras dos grupos G3 e G4 observaram-se grande quantidade de material (hidróxido de cálcio) no interior dos túbulos dentinários localizados adiante da interface material-dentina (figura 5.17).

Figura 5.15- Amostra representativa do grupo 7: o hidróxido de cálcio recobriu, praticamente, toda a superfície dentinária das cavidades preparadas e se apresentou com aspecto granuloso - corte transversal - aumento de 500 X (a) e de 1000 X (b)

Figura 5.16- Amostra representativa do grupo 3 (associação hidróxido de cálcio + Er:YAG) - foram observadas zonas de derretimento e fusão do material - corte transversal - (a) aumento de 500 X e (b) aumento de 1000 X

Figura 5.17- Amostra representativa do grupo 4 (associação hidróxido de cálcio + diodo) - zonas de fusão do material provocadas pela radiação laser, em um aumento de 500 X (a) e de 1000 X (b)

Figura 5.18- Eletromicrografia da amostras do grupo 4 (corte longitudinal) - houve penetração de grande quantidade de hidróxido de cálcio no interior dos túbulos dentinários- a - aumento de 500X b- aumento de 1000X

● cavidade ► interface cavidade/ dentina ■ superfície dentinária

5.2.3 Aspectos morfológicas das amostras tratadas com MTA associadas ao não à radiação com laser (G8, G5 e G6)

No grupo 7, no qual as amostras foram tratadas com MTA, observou-se que o material cobriu toda a superfície dentinária da cavidade preparada e se apresentou com aspecto granuloso e heterogêneo (figura 5.19).

Nos grupos 5 e 6 (MTA + radiação laser) observou-se que os dois tipos de radiação provocaram alterações na superfície do material. Entretanto, nas amostras irradiadas com o laser Er:YAG ocorreram maiores zonas de derretimento e fusão (figuras 5.20 e 5.21).

Foi verificado, ainda, nos cortes longitudinais das amostras dos grupos 5 e 6, a presença de MTA no interior dos túbulos dentinários (figura 5.22), mas em menor quantidade se comparado às amostras dos grupos G3 e G4 (figura 5.18).

Figura 5.19- Amostra do grupo 8: o MTA se apresentou com aspecto granuloso e recobriu praticamente toda a superfície dentinária da cavidade - corte transversal - aumento de 500 X (a) e de 1000 X (b)

Figura 5.20- Amostra do grupo 5 (associação MTA + Er:YAG) - zonas de fusão do material provocadas pela irradiação com laser- corte transversal - aumento de 500 X (a) e de 1000 X (b)

Figura 5.21- Eletromicrografia representativa das amostras do grupo 6 (associação MTA + diodo) - observou-se zonas de fusão do material provocadas pela irradiação com laser - corte transversal - (a) aumento de 500 X e (b) aumento de 1000 X

penetração do MTA no interior dos túbulos dentinários. a- aumento de 500 X

● cavidade ► interface cavidade/ dentina ◆ superfície dentinária

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Da importância do tema

Uma das funções da pesquisa na área da saúde é a busca de novos conhecimentos, que permitam o desenvolvimento de novas intervenções que, por sua vez, possam atuar em patologias que ainda estão fora de controle (REMME et al., 2002).

As reabsorções radiculares externas, com exceção da rizólise dos dentes decíduos, são consideradas processos patológicos (SOARES, 2002) caracterizados por perda de volume das raízes dentárias. Quase sempre, são seqüelas de um dano ao ligamento periodontal, podendo ser decorrentes de procedimentos endodônticos, inflamações crônicas, movimentações ortodônticas, doenças periodontais e, principalmente, de um trauma agudo (ESBERARD; ESBERARD; ESTRELA, 2002).

Nas reabsorções decorrentes de traumatismo dental, principalmente quando um ou mais dentes foram avulsionados e permaneceram fora do alvéolo por um longo período de tempo, o prognóstico é bastante duvidoso e, muitas vezes, ocorre a perda do elemento dental (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Danos nas células do ligamento periodontal, em especial nos cementoblastos, permitem a exposição dos tecidos mineralizados. Estes, por sua vez, funcionam como atrativo para as células clásticas que poderão dar início ao

processo de reabsorção dentária. Após o reimplante, os cementoblastos são substituídos por osteoblastos, que apresentam receptores para o paratormônio. Este fato, aliado ao contato osso/ dentina/ cimento, permite que o dente participe da renovação óssea sendo, assim, gradativamente substituído por osso, propiciando a exposição de antígenos seqüestrados e desencadeando a resposta imunopatológica (CONSOLARO, 2002; HIDALGO, 2001).

Várias propostas terapêuticas têm sido sugeridas visando a prevenção ou estabilização das reabsorções radiculares. O tratamento da superfície radicular, anteriormente aos reimplantes tardios, tem sido preconizado para a remoção do ligamento periodontal necrosado, a hidratação de remanescente de tecido conjuntivo viável que se encontre aderido à superfície, para a preservação da estrutura radicular; a inibição de células reabsortivas e ainda, a promoção do reparo por meio da neoformação cementária (BJORVATN; MASSLER, 1971; IGBAL; BAMAAS, 2001; LEVIN et al., 2001; MORI; GARCIA, 2002). Entretanto, os resultados destas terapêuticas, até o presente momento, são contraditórios, impossibilitando a afirmativa de que os mesmos são efetivos na prevenção das reabsorções radiculares externas.

Independente do fator causal, a terapia endodôntica, com a remoção da polpa necrosada e a utilização de medicamentos no interior dos canais radiculares é imprescindível para o controle e combate das reabsorções radiculares externas, uma vez que a contaminação microbiana é um fator que agrava o quadro de reabsorção (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

O hidróxido de cálcio é a medicação de eleição para prevenção e tratamento das reabsorções, pelas suas propriedades antimicrobianas, de formação

de tecido duro e principalmente pelo seu pH alcalino, já que as células clásticas atuam em pH ácido (ESBERARD; ESBERARD; ESTRELA, 2002; FOSTER; KULILD; WELLER, 1993; TRONSTAD et al., 1981). Entretanto, o hidróxido de cálcio nem sempre é efetivo para o tratamento das reabsorções radiculares externas, em especial, as substitutivas (HAMMARSTRÖM et al., 1986). Além disso, estudos têm constatado que quando usado por período prolongado, pode estimular o aparecimento da anquilose (ANDREASEN; KRISTERSON, 1981; LENGHEDEN et al., 1991a; LENGHEDEN et al., 1991b).

Desta forma, fica claro, que ainda não foi encontrado um tratamento efetivo para prevenção e combate das reabsorções radiculares externas.

Tais fatos abordados justificam a realização deste estudo, por meio do qual pretende-se avaliar novas alternativas para o tratamento das reabsorções radiculares externas, que possam, no futuro, favorecer o prognóstico desta patologia.

6.2 Da metodologia empregada

Neste estudo foram selecionados dentes recém-extraídos de humanos, armazenados em solução de PBS. Embora todos os procedimentos de manuseio dos dentes e preparo dos fragmentos radiculares tenham sido realizados com uso de instrumentais e luvas estéreis, as amostras foram esterilizadas após cada manipulação. Estes cuidados são fundamentais quando se trabalha com cultura de

células para evitar possível contaminação por fungo, levedura, bactéria e micoplasma (FRESHNEY, 2000).

Cabe ressaltar que o último processo de esterilização das amostras, logo após receberem os diferentes tratamentos experimentais, foi realizado com radiação Gama, pois no estudo piloto, observou-se que a esterilização efetuada pelo calor úmido provocou escurecimento dos materiais estudados e, em duas amostras, o deslocamento do material das suas respectivas cavidades.

Com relação ao preparo das amostras, a broca em forma de disco nº 12205 foi selecionada por permitir a confecção de cavidades planas e, portanto, mais padronizadas. Ademais, a utilização desta broca de 0,5 mm de espessura possibilitou um desgaste de forma a garantir a exposição da superfície dentinária. Ainda buscando uma maior padronização, foi desenvolvido um dispositivo que possibilitou a fixação da caneta de alta rotação, da broca e dos dentes. Este dispositivo não permitiu movimentos de lateralidade da caneta de alta rotação e controlou a profundidade de penetração da broca. Desta forma, foram obtidas cavidades exatamente com a mesma profundidade e diâmetro da broca de alta rotação. Esta padronização visou, principalmente, o controle dos níveis de energia nos grupos irradiados com laser (G1, G2, G3, G4, G5 e G6).

Com relação aos materiais de uso endodôntico, é importante salientar que por ser utilizado na forma de pasta e não endurecer como o MTA, a fricção do hidróxido de cálcio nas cavidades preparadas foi realizada objetivando melhor contato com a superfície dentinária, assim como a adaptação e permanência do material na cavidade.

Quanto aos parâmetros da radiação dos sistemas lasers utilizados no presente estudo, cabe ressaltar que o tratamento da superfície por meio da radiação

laser é uma modalidade nova, sendo assim, ainda não se têm protocolos bem definidos dos parâmetros do laser Er:YAG e, principalmente, do laser de diodo. Em vista disso, buscou-se na literatura, os parâmetros que possibilitaram resultados favoráveis com relação à utilização dos referidos lasers nas superfícies radiculares (RALDI et al., 2006; THEODORO et al., 2003), os que tiveram comprovada ação antimicrobiana (KREISLER et al., 2003; MORITZ et al., 1999; RADAELLI, 2002; YAMAGUCHI et al., 1997) assim como, os que não provocaram danos térmicos nas áreas irradiadas (KREISLER et al., 2001; GULIN, 2003; THEODORO et al., 2003)

Para o laser Er:YAG foram utilizados: energia de pulso de 100 mJ (no monitor) - 42 mJ (na saída da fibra) e taxa de repetição (frequência) de 10 Hz, uma fibra óptica de 375 µm, no modo contato, com o tempo total de exposição de 10 segundos e fluência na saída da fibra de 38 J/cm².

Para o laser de diodo optou-se por: 1,2 W de potência (no monitor) - 1 W (na saída da fibra), uma fibra óptica de 400µm sem contato com a superfície, com o tempo total de exposição de 10 segundos e intensidade de potência de 796 W/cm².

A perda de energia durante a passagem da radiação laser pela ponta da fibra óptica é um fator que deve ser discutido quando se calcula a energia de pulso e os demais parâmetros de uma irradiação laser. Esta perda depende do material e das dimensões da fibra, sendo calculada multiplicando-se a energia indicada no monitor pelo fator de transmissão de cada fibra, o qual é fornecido pelo fabricante. As pontas das fibras ópticas do laser Er:YAG utilizadas na periodontia possuem diâmetros maiores quando comparadas às utilizadas na endodontia e, conseqüentemente, o fator de transmissão é maior nas fibras periodontais, isto é, há menor perda de energia por pulso.

Quanto à metodologia empregada para avaliação da biocompatibilidade dos tratamentos realizados, optou-se por utilizar um teste primário ou inicial de avaliação da biocompatibilidade, em razão das propostas no presente estudo serem novas. A utilização de testes *in vitro* é indicada como etapa anterior aos testes em animais e humanos. Tanto a ADA/ANSI como a ISO⁹ recomendam a utilização de testes *in vitro* no primeiro nível de avaliação de um biomaterial. Estes testes têm como objetivos a proteção do ser humano, além de assegurar o bem-estar dos animais, reduzir o seu número e a exposição a que são submetidos. Além disso, a avaliação de materiais em cultura de células constitui um meio rápido, reproduzível para essa determinação (FRESHNEY, 2000).

A metodologia para verificação da aderência celular foi semelhante à utilizada no estudo de Feist (2002), no qual o autor avaliou a aderência de fibroblastos em superfícies radiculares irradiadas com laser Er:YAG. Entretanto, no presente estudo, utilizou-se o programa ImageLab para a contagem dos fibroblastos aderidos, o que facilitou muito esta manobra. Este programa possui uma ferramenta que demarca o número de células. Além disso, oferece um recurso que inverte o contraste da imagem, fato que auxiliou na identificação das células, principalmente, nas amostras dos grupos nos quais elas se apresentaram em maior número e muito próximas umas das outras (G I e G II).

Por fim, a análise em MEV procurou estabelecer uma relação entre os achados da adesão celular e das alterações morfológicas ocorridas, de forma a complementar e esclarecer os efeitos causados pela radiação laser nas superfícies dentinárias expostas, assim como nos materiais de uso endodôntico.

⁹ American Dental Association (ADA), American National Standard Institute (ANSI) e a e International Organization for Standardization (ISO) - organizações que visam padronizar testes para a avaliação da biocompatibilidade de biomateriais.

6.3 Dos resultados obtidos

Para melhor compreensão da discussão dos resultados obtidos neste experimento, esta parte do capítulo “Discussão” foi subdividida em três tópicos: discussão dos resultados obtidos nos grupos irradiados com laser; dos resultados obtidos nos grupos tratados com materiais de uso endodôntico e dos resultados obtidos nos grupos nos quais se realizou a associação dos materiais de uso endodôntico com a radiação laser.

6.3.1 Discussão dos resultados nos grupos tratados com radiação laser (G1e G2)

Na análise dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se verificar com relação à adesão celular, que as amostras dos grupos irradiados com laser (G1 e G2) apresentaram um maior número de células aderidas quando comparado com as dos demais grupos (G3, G4, G5, G6, G7 e G8) e com as do grupo controle (G9), havendo diferença estatisticamente significante entre estes (G1 e G2) e os outros grupos (G3, G4, G5, G6, G7, G8 e G9).

Dentre os grupos irradiados (G1 e G2) as amostras irradiadas pelo laser Er:YAG (G1) apresentaram os melhores resultados.

Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, nos quais têm-se verificado uma maior adesão celular em superfícies radiculares irradiadas com laser Er:YAG quando comparada às superfícies não tratadas (RALDI

et al., 2006) e com aquelas que receberam apenas raspagem e aplainamento radicular (FEIST, 2002; SCHOOP et al., 2001). Tais resultados têm sido correlacionados com as modificações estruturais provocadas pela radiação laser nessas superfícies.

No presente estudo, foram observadas na superfície dentinária das amostras irradiadas com laser Er:YAG (G1) microrugosidades com aspecto de escamas sobrepostas, ausência de *smear layer* e os túbulos dentinários apresentaram-se abertos. Não foram observados sinais de carbonização, fendas ou trincas.

Estas características morfológicas têm sido observadas em vários estudos (CECCHINI et al., 1999; RALDI; LAGE-MARQUES, 2003; TANJI; MATSUMOTO; EDUARDO, 1997; TAKEDA et al., 1998; THEODORO et al., 2003) e se devem à alta interação do laser Er:YAG com os tecidos mineralizados, em decorrência do seu comprimento de onda de 2,94 μm ser altamente absorvido pela água e hidroxiapatita presente nos tecidos mineralizados e, desta forma, quando aplicada nos tecidos duros dentais, a radiação laser é fortemente absorvida. O aumento da temperatura intersticial do tecido aumenta a pressão do meio e provoca a ejeção deste tecido por micro-explosões, processo conhecido como ablação explosiva (HIBST; KELLER, 1989; KAYANO et al., 1991).

A maior adesividade de fibroblastos nas superfícies irradiadas com laser Er:YAG têm sido atribuída à criação de microrugosidades nestas superfícies (FEIST, 2002); que por sua vez aumentariam a retenção física das células (THEODORO, 2003). Adicionalmente, segundo Blömlöf (1996) e Sant'Ana (2001), a presença de *smear layer* na superfície dentinária dificulta a adesão, migração e proliferação celular sobre a superfície. Portanto, a remoção do *smear layer* seria um outro fator

relevante para justificar a maior adesão dos fibroblastos nas superfícies irradiadas com o laser Er:YAG.

Em concordância com os estudos acima citados, verificamos nas amostras irradiadas com laser Er:YAG, uma maior adesão celular nos locais tocados pela fibra óptica. Nas eletromicrografias, foi possível observar que estas áreas estavam totalmente livres de *smear layer* e com túbulos dentinários abertos.

Cabe ressaltar que os parâmetros da radiação laser são de extrema importância na obtenção de superfícies com características favoráveis à adesão e à proliferação celular. Feist (2002) verificou um aumento significativo na adesão e na proliferação fibroblástica em superfícies irradiadas com laser de Er:YAG (35 mJ, 10 Hz, 3 J/cm²) quando comparado a um grupo que não foi irradiado com laser e outro irradiado com o mesmo laser, mas com energia de pulso maior (59 mJ, 10 Hz, 5 J/cm²).

Com relação ao grupo irradiado com laser de diodo (G2), observamos que as superfícies radiculares das amostras deste grupo se apresentaram com aspecto menos rugoso do que as irradiadas com laser Er:YAG, os túbulos dentinários estavam fechados e, em grande parte das amostras, houve remoção do *smear layer*, embora outras tenham apresentado uma pequena quantidade, porém bem menor do que no grupo controle. Em nenhuma amostra foram observadas zonas de carbonização, assim como trincas.

Nossos resultados coincidem com os obtidos por Theodoro et al. (2003) no qual analisaram *in vitro* os efeitos térmicos dos lasers Er:YAG (60 mJ - 7,65 J/cm; 100 mJ - 12,9 J/cm²) e do laser de diodo utilizado com 1.0 W e 2W de potência (900 W/cm² e 1080 W/cm²), quando aplicados em superfícies radiculares por um período de 30 segundos no modo interrompido. Foi verificado nas eletromicrografias que não ocorreram alterações morfológicas tais como: carbonização, derretimento, crateras

ou fusão do cimento. Entretanto, nas amostras irradiadas com laser de Er:YAG, as superfícies demonstraram-se mais irregulares e mais pronunciadas quando comparadas com as irradiadas com o laser de diodo.

Acreditamos que as diferenças morfológicas observadas entre os dois grupos (G1 e G2) se devem, principalmente, às diferenças de comprimento de onda entre os dois lasers e, desta forma, eles interagem de maneira diferente com os tecidos duros dentais. Os mecanismos de interação com os tecidos mineralizados têm sido descritos como fototérmicos para ambos os lasers, mas predominantemente fotoablativo no caso do laser Er:YAG. (THEODORO, 2003).

A radiação do laser de diodo de alta intensidade, por possuir um comprimento de onda entre 800–980 nm, é preferencialmente absorvida por tecidos pigmentados (hemoglobina e melanina) e fracamente absorvida por água e hidroxiapatita (MALDONADO, RIBEIRO; ZECELL, 2000; AOKI et al., 2004). Por esta razão, quando aplicada em tecidos duros dentais, a energia absorvida é transformada em calor aumentando a temperatura da superfície, de forma distinta da radiação do laser de Er:YAG, que é altamente absorvida pela água presente nos tecidos. Desta forma, o calor gerado pelo laser Er:YAG é absorvido rapidamente e os danos térmicos produzidos nas áreas adjacentes são mínimos. (KAYANO et al., 1991, SASAKI et al., 2002).

Pelas razões acima citadas, estudos publicados têm evidenciado que o laser de diodo deve ser utilizado com muita prudência nas superfícies radiculares, evitando que parâmetros inadequados de irradiação provoquem danos térmicos indesejáveis como carbonização, danos pulpares e ósseos.

Gulin (2003) observou características morfológicas semelhantes às observadas neste estudo em superfícies cementárias irradiadas com laser de diodo

com potência de 1,0 W. Neste parâmetro as superfícies radiculares se apresentaram com maior lisura e homogeneidade e com menor quantidade de *smear layer* quando comparadas com o grupo controle. Entretanto, os grupos irradiados com 1,2 W, 1,4 W e 1,6 W apresentaram ranhuras evidentes intercaladas com áreas lisas homogêneas.

Kreisler et al. (2002) não observaram danos térmicos nas superfícies radiculares irradiadas com laser de diodo com a mesma potência utilizada neste estudo (1 W), entretanto quando utilizadas as potências de 1,5 W, 2,0 W e 2,5 W, ocorreu carbonização parcial ou total dos espécimes irradiados.

O aspecto da biocompatibilidade superficial de áreas irradiadas com laser de diodo segue o mesmo raciocínio da absorção da radiação laser e da interação com o tecido alvo. Estes podem gerar efeitos térmicos e alterações morfológicas, que por sua vez podem interferir na adesão celular na área irradiada (KREISLER et al., 2002). No presente estudo, as alterações morfológicas provocadas nas superfícies irradiadas com laser diodo (G2) permitiram uma maior adesão de células quando comparado com o grupo controle (G9) e os grupos (G3, G4, G5, G6, G8 e G8).

Poucos são os trabalhos na literatura avaliando a biocompatibilidade de superfícies radiculares irradiadas com laser de diodo.

Raldi et al. (2006), em um estudo anteriormente realizado, observaram resultados semelhantes aos do presente estudo. Os grupos irradiados com laser de diodo e com laser Er:YAG apresentaram um maior número de células aderidas quando comparados com o grupo controle, que não recebeu qualquer tipo de tratamento. Entretanto, neste estudo os autores observaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos irradiados. Tal resultado pode

ser explicado pelos diferentes parâmetros de energia utilizados para o laser Er:YAG. No estudo anterior foi utilizada uma energia de pulso menor (24 mJ - saída, 228 J/cm²) que a utilizada no presente experimento (42 mJ - saída, 38J/cm²) e foi observado que, embora tenham ocorrido alterações estruturais nas superfícies dentinárias irradiadas, as mesmas apresentaram com maior quantidade de *smear layer* e menor número de túbulos dentinários abertos do que o observado no presente estudo. Este achado reforça a hipótese de que a criação de microrugosidades superficiais e a remoção do *smear layer* possam, realmente, favorecer a adesão celular.

Assim como neste estudo, Haypek (2005) verificou que interação entre o laser diodo (potência de 1,5 W em modo pulsado e contínuo - 597 W/cm² e 1194 W/cm²) e superfícies radiculares irradiadas causou alterações morfológicas superficiais similares nos dois modos de aplicação, sem causar danos deletérios às superfícies tornando-as biocompatíveis a adesão e proliferação celular.

Em contrapartida, Theodoro (2003), após avaliar *in vitro* a adesão de elementos sanguíneos sobre superfícies radiculares irradiadas com laser de Er:YAG e de diodo, e a ação destes sobre as superfícies radiculares, verificou que nenhum tratamento proposto aumentou a adesão de elementos sanguíneos de forma significativa quando comparado ao controle. Segundo o autor, o laser diodo, dependendo dos parâmetros de irradiação, pode inibir a adesão de elementos sanguíneos.

A diversidade de parâmetros empregados nos diferentes estudos realizados torna difícil a comparação dos resultados e justifica algumas variáveis obtidas neste experimento. Todavia, pode-se verificar que os parâmetros utilizados

no presente estudo, tanto para o laser Er:YAG como para o laser de diodo, favoreceram a adesão celular nas superfícies radiculares.

Tais resultados encorajam a realização de novas investigações, possivelmente em animais, com o objetivo de verificar a biocompatibilidade *in vivo* do tratamento de superfícies radiculares por meio de radiação laser, como uma nova proposta terapêutica para prevenção das reabsorções radiculares externas nas situações de reimplante tardio, bem como para a estabilização desta patologia, principalmente, quando localizada no terço radicular cervical.

6.3.2 Discussão dos resultados nos grupos tratados com materiais de uso endodôntico (G7 e G8)

Quando os defeitos radiculares provocados pelas reabsorções radiculares externas atingem dimensões maiores, faz-se necessária a intervenção cirúrgica e o selamento da cavidade com materiais obturadores (MATTAR; MATTAR, 2003). Materiais como amalgama, ionômero de vidro e resina composta têm sido propostos para esse fim (AL-NAZHAN, 1991; SCHERER; DRAGOO, 1995; WHITE JR, 1998).

A seleção do MTA para o presente experimento deveu-se ao fato de que poucos trabalhos o analisaram como material selador de reabsorções radiculares. Embora tenham sido relatados resultados favoráveis, na estabilização do processo reabsortivo, são apenas relatos de casos clínicos (BARATTO FILHO et al., 2005; WHITE JR; BRYANT, 2002).

Neste estudo, embora tenha apresentado resultado inferior quando comparado aos grupos irradiados com laser Er:YAG e de diodo, o grupo tratado com MTA (G8) permitiu a adesão celular, não havendo diferença estatisticamente significativa entre este e o grupo controle.

Nossos resultados estão de acordo com os resultados relatados por Parirokh et al. (2005) e Ribeiro et al. (2005), que constatarem a biocompatibilidade do MTA por meio da análise histológica em polpa de cães e por meio da adesão de linfomas, respectivamente.

Aranha et al. (2006) notaram ligeira toxicidade do MTA branco (Angelus) sobre a morfologia e o metabolismo de células odontoblastóides MDPC-23. Entretanto, é preciso ressaltar que efeitos tóxicos *in vitro* não significam, necessariamente, toxicidade *in vivo*. No sistema *in vitro*, as células estão expostas diretamente ao agente agressor ou a seus produtos, e o meio não se renova por cerca de 2 a 3 dias, concentrando possíveis componentes tóxicos. No sistema *in vivo*, a homeostase proporcionada pelos fluidos pode agir protegendo o organismo, removendo a toxina do sítio de implantação, se o fator em questão for solúvel (TAKAMORI, 2004).

Com relação ao grupo tratado com hidróxido de cálcio (G7), observou-se, no presente estudo que, praticamente, não houve adesão de fibroblastos nas cavidades tratadas com este material. Tais resultados podem ser justificados pelo pH alcalino promovido no local pela pasta de hidróxido de cálcio, o que teria impedido a adesão celular nas primeiras 24 horas.

Lenghden (1994) avaliaram a influência do pH no crescimento e adesão de fibroblastos e demonstraram que mudanças no pH acima de 7,8 diminuem

significativamente tanto a adesão quanto o crescimento de fibroblastos do ligamento periodontal.

Cabe ressaltar que, na prática clínica diária, a pasta de hidróxido de cálcio não é utilizada como material selador, e sim, como medicação intracanal. Desta forma, não há um contato direto deste medicamento com o ligamento periodontal.

No entanto, segundo Hammarström et al. (1986) e Lencheden, Blomlof e Lindskog (1991) o aumento do pH na superfície radicular, causado pelo hidróxido de cálcio utilizado com medicação intracanal, teria efeito necrosante sob as células de reparo do periodonto, e quando uma área suficientemente grande fosse afetada, o tecido necrótico poderia ser absorvido, originando a reabsorção por substituição.

Assim sendo, com relação aos materiais de uso endodôntico propostos neste estudo, baseado nos resultados obtidos e na revisão da literatura podemos afirmar que o MTA branco mostrou ser biocompatível e um material promissor para o selamento de reabsorções radiculares externas quando há necessidade de intervenção cirúrgica.

Quanto ao hidróxido de cálcio, os resultados apontam para a necessidade de novas investigações sobre os efeitos dessa medicação de uso intracanal nas células do ligamento periodontal, principalmente, nas situações em que as reabsorções encontram-se em estágio mais avançado, nas quais há proximidade ou contato direto entre o medicamento e o periodonto.

6.3.3 Discussão dos resultados nos grupos tratados com a associação materiais de uso endodôntico e radiação laser (G3, G4, G5 e G6).

Estudos recentes têm verificado os efeitos da associação da radiação laser com substâncias irrigantes de uso intracanal, buscando favorecer a limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares (BRUGNERA JÚNIOR, 2001; PÉCORA et al., 2000; RALDI; LAGE-MARQUES, 2003). Entretanto, ainda não estão disponíveis na literatura estudos que avaliaram a ação da irradiação de materiais de uso endodôntico com lasers de alta potência.

A proposta de associar materiais de uso endodôntico com a radiação laser, para tratamento de reabsorções radiculares simuladas, foi baseada em estudos na área de implantodologia, que têm preconizado o tratamento da superfície de implantes de titânio com lasers de alta potência, objetivando promover alterações nestas superfícies, de forma a melhorar ou mesmo acelerar o processo de osseointegração (GYORGY et al., 2002; HALLGREN et al., 2003).

Seguindo essa linha de raciocínio, foi idealizada a hipótese de que a aplicação de radiação laser no MTA e no hidróxido de cálcio promoveria alterações morfológicas nas superfícies destes materiais, as quais poderiam favorecer a adesão celular.

Os resultados do presente experimento mostraram que a irradiação com os lasers Er:YAG e de diodo provocou mudanças morfológicas nas superfícies do hidróxido de cálcio e do MTA em todas as amostras dos grupos G3, G4, G5 e G6. Foi possível observar nas eletromicrografias, zonas de derretimento e fusão em

várias áreas das amostras e, nesses locais, os materiais apresentaram superfícies mais lisas quando comparadas às superfícies não irradiadas (G7 e G8).

Em relação à adesão celular, os resultados evidenciaram-se contraditórios. No hidróxido de cálcio, a irradiação com os lasers de Er:YAG e de diodo promoveu aumento do número de células aderidas (GIII e GIV), enquanto que no MTA (GV e GVI), a radiação laser promoveu pequena redução do número de células.

Pela metodologia empregada neste estudo, não foi possível identificar se a adesão celular foi maior ou menor nas áreas onde ocorreu derretimento e fusão do material. E, como citado anteriormente, não existem trabalhos na literatura associando a radiação laser com os materiais utilizados neste experimento. Desta forma, não foram encontrados subsídios para justificar os diferentes resultados obtidos em relação à adesão celular nestes grupos experimentais.

Diante disso, novos estudos devem ser realizados buscando elucidar os resultados obtidos na variável associação materiais de uso endodôntico com irradiação laser, assim como, verificar se além das alterações morfológicas, a energia laser provoca mudanças estruturais que possam alterar as propriedades físico-químicas destes materiais.

Por fim, as propostas para tratamento de reabsorções radiculares investigadas neste estudo *in vitro* mostraram resultados promissores, tais como os obtidos frente à irradiação das superfícies dentinárias com os lasers Er:YAG e de diodo e com o selamento das cavidades simuladas por meio do MTA. Por outro lado, alguns resultados necessitam ser elucidados, como no caso daqueles obtidos pela associação dos materiais de uso endodôntico com os referidos lasers. Assim sendo, este experimento abre um vasto campo para realização de novas investigações *in*

vitro, em animais e, futuramente, em humanos, objetivando a busca de alternativas eficazes para prevenção e o tratamento das reabsorções radiculares externas.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e considerando-se as condições específicas deste experimento, pode-se concluir que:

1. No que se refere à irradiação da superfície dentinária das reabsorções simuladas: a irradiação com os lasers Er:YAG e de diodo provocou alterações morfológicas na superfície dentinária que favoreceram a adesão celular.
2. No que se refere ao preenchimento das cavidades com materiais de uso endodôntico: o uso do MTA nas reabsorções radiculares simuladas permitiu a adesão celular, enquanto que o hidróxido de cálcio a inibiu.
3. No que se refere à associação dos materiais de uso endodôntico com a radiação laser:
 - A irradiação do MTA com os lasers Er:YAG e de diodo provocou alterações morfológicas na superfície do material que resultaram em uma discreta diminuição no número de células aderidas.
 - A irradiação do hidróxido com os lasers Er:YAG e de diodo provocou alterações morfológicas na superfície do material que resultaram em um discreto aumento no número de células aderidas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

Almeida MG, Melo GC, Saraiva PP. Tratamento químico da superfície radicular. *Salusvita* 2003;22(1):133-47.

al-Nazhan S. External root resorption after bleaching: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;72(5):607-9.

American Association of Endodontics. Treating the avulsed permanent tooth. 2004. URL:<http://www.aae.org>. [2006 Ago.12].

Andreasen JO, Andreasen FM. Root resorption following traumatic dental injuries. *Proc Finn Dent Soc* 1992;88(Suppl1):p.95-114.

Andreasen JO, Andreasen FM. Texto e atlas colorido de traumatismo dental. São Paulo: Ed. Artmed, 2001.

Andreasen JO, Hjørting-Hansen E. Replantation of teeth. I - Radiographic and clinical study of 110 human teeth replanted after accidental loss. *Acta Odontol Scand* 1966a; 24(3):263-86.

Andreasen JO, Hjørting-Hansen E. Replantation of teeth. II. Histological study of 22 replanted anterior teeth in humans. *Acta Odontol Scand* 1966b; 24(3):287-306.

Andreasen JO, Kristerson L. The effect of extra-alveolar root filling with calcium hydroxide on periodontal healing after replantation of permanent incisors in monkeys. *J Endod.* 1981;7(8):349-54.

Antenucci EL. Integration of lasers into a soft tissue management program. *Dent Clin North Am* 2000;44(4):811-9.

Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol* 2000. 2004;36:59-97.

Aranha AMF, Lessa FCR, Hebling J, Costa CAS. Efeitos do cimento MTA-branco sobre a morfologia e o metabolismo de células odontoblastóides MDPC-23. *Brazilian Oral Res* 2006;20 (supl):179.

Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005;31(2):101-3.

Babay N. Attachment of human gingival fibroblasts to periodontally involved root surface following scaling and/or etching procedures: a scanning electron microscopy study. *Braz Dent J* 2001;12(1):17-21.

Balto HA. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscope study. *J Endod* 2004;30(1):25-29.

Baratto-Filho F, Limongi O, Araujo C de J, Neto MD, Maia SM, Santana D. Treatment of invasive cervical resorption with MTA: case report. *Aust Endod J* 2005;31(2):76-80.

Barret EJ, Kenny DJ. Avulsed permanent teeth: a review of the literature and treatment guidelines. *Endod Dent Traumatol* 1997;13(4):153-63.

Benenati FW. Root resorption: types and treatment. *Gen Dent* 1997;45(1):42-5. Review.

Berkiten M, Berkiten R, Okar I. Comparative evaluation of antibacterial effects of Nd:YAG laser irradiation in root canals and dentinal tubules. *J Endod* 2000;26(5):268-70.

Bjorvatin K, Massler M. Effect of fluorides on root resorption in replanted rat molars. *Acta Odontol Scand* 1971;29(1):17-29.

Blomlöf JPS. Root cementum appearance in healthy monkeys and periodontitis-prone patients after different etching modalities. *J Clin Periodontol* 1996;23(1):12-8.

Brugnera Jr A. Estudo da ação dos lasers Er: YAG e Nd: YAG sobre a permeabilidade da dentina das paredes dos canais radiculares instrumentados [Tese Doutorado] Rio de Janeiro: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2001.

Brugnera Junior A, Santos AECG, Bologna ED. Atlas de laser terapia aplicada à clínica odontológica. São Paulo: Livraria e Editora Santos, 2003.

Cecchini SCM, Zezell DM, Bachmann L, Pinotti MM, Nogueira GEC, Strefezza C, et al. Evaluation of two laser systems for intracanal irradiation. In: Lasers in Dentistry V, Proc. SPIE 1999;3593:31-5.

Cecchini SCM. Estudo *in vitro* das aplicações do laser Hólmio: YLF em esmalte e dentina, visando a realização de cirurgia de acesso endodôntico e preparo cavitário [Dissertação de Mestrado] São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo; 1995.

Chambers TJ. The pathobiology of the osteoclast. J Clin Pathol 1985;38(3):241-52.

Cogen RB, Al-Joburi W, Gantt DG, Denys FR. Effect of various root surface treatments on the attachment and growth of human gingival fibroblasts: histologic and scanning electron microscopic evaluation. J Clin Periodontol. 1984;11(8):531-9.

Consolaro A. Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. Ed. Maringá: Dental Press; 2002.

Cozean C, Arcoria CJ, Pelagalli J, Powell GL. Dentistry for the 21st century? Erbium:YAG laser for teeth. J Am Dent Assoc 1997;128(8):1080-7.

Eduardo CP, Gouws-Soares SC, Haypek P. Utilização clínica dos lasers. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. Dentística / Laser. São Paulo: Artes Médicas; 2002. cap. 23, p.441-61.

Eduardo CP, Pelino JEP, Haypek P. The clinical use of lasers in Dentistry. In: Abstracts of the 1st Congress of the European Society for Oral Applications ESOLA 2001;(abs 7):17-20.

Eriksson JH, Albrektsson T. Temperature threshold levels for heat induced bone tissue injury: a vital microscopic study in the rabbit. J Prosthet Dent 1983; 50(1):101-7.

Esberard RM, Esberard RR, Estrela CB. Tratamento das reabsorções radiculares. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN Endodontia/Trauma. São Paulo: Artes Médicas, 2002. cap.19, p.409-43.

Featherstone JD. Caries detection and prevention with laser energy Dent Clin North Am 2000;44(4):955-69.

Feist IS. Adesão e proliferação de fibroblastos de gengiva humana cultivados sobre superfícies radiculares tratadas com laser de Er:YAG [Tese de Doutorado] São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP, 2002.

Foster KH, Kulild JC, Weller N. Effect of *smear layer* removal on the diffusion of calcium hydroxide through radicular dentin. J Endod 1993;19(3):136-40.

Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 4.ed. New York: Wiley-Liss. 315 p.

Friedman S, Komorowski R, Maillet W, Nguyen HQ, Torneck CD. Susceptibility of Nd:YAG laser-irradiated root surfaces in replanted teeth to external inflammatory resorption. Endod Dent Traumatol 1998; 14(5):225-31.

Garrett JS, Crigger M, Egelberg J. Effects of citric acid on diseased root surfaces. J Periodontal Res 1978;1 3(2):155-63.

Greenfield EM, Bi Y, Miyauchi A. Regulation of osteoclast activity. Life Sci. 1999; 65(11):1087-102

Gulin M. Avaliação da alteração morfológica da superfície cementária irradiada com laser de diodo [Dissertação de Mestrado Profissionalizante] São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares /Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2003.

Gutknecht N, Moritz A, Conrads G, Sievert T, Lamper TF. Bacterial effect of Nd:YAG laser *in vitro* root canals. J Clin Laser Med Surg 1996;14(2):77-80.

Gutknecht N, Franzen R, Schippers M, Lampert F. Bactericidal effect of a 980-nm diode laser in the root canal wall dentin of bovine teeth. J Clin Laser Med Surg 2004;22(1):9-13.

György E, Pérez Del Pino A, Serra P, Morenza J L. Surface nitridation of titanium by pulsed Nd:YAG laser irradiation. Appl. Surface Sci. 2002;186:130-34.

Hale GM, Querry MR. Optical constants of water in the 200-nm to 200- μ m wavelength region. *Appl Opt* 1973;12:555–63.

Hallgren C, Reimers H, Chakarov D, Gold J, Wennerberg A. An in vivo study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. *Biomaterials* 2003; 24:701.

Hammarström L, Blömof L, Feiglin B, Lindskog S. Effect of calcium Hydroxide treatment on periodontal repair and root resorption. *Dent Traumatol* 1986;2(5):184-9.

Hammarström L, Lindskog S. General morphological aspects of resorption of teeth and alveolar bone. *Int Endod J* 1985;18(2):93-108.

Haypek P, Cardoso W, Eduardo CP. The use of Er:YAG, Nd:YAG and Ga-Al-As lasers in periapical surgery: a 3-year clinical study. *J Clin Laser Med Surg* 2001;19(4):193-8.

Haypek P. Interação do laser de diodo de alta potência com a superfície radicular. Efeito na morfologia, na variação de temperatura e na adesão e proliferação de fibroblastos em cultura [Tese de Doutorado] São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

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(4):338-44.

Hidalgo MMY. Contribuição para a etiopatogenia da reabsorção dentária [Tese de Doutorado] Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru-USP; 2001.

Hill PA, Orth M. Bone remodeling. *Brit J Orthod* 1998;25(2):101-7.

Holland R, Otoboni Filho JA, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Dezan Jr E. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod* 2001;27(4):281-4.

Hopewell-Smith A. The process of osteolysis and odontolysis, or so called "absorption" of calcified tissues: a new original investigation. *Dent Cosmos* 1930;72(10):1036-48.

Iqbal MK, Bamaas N. Effect of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) upon periodontal ligament healing after replantation of permanent incisors in beagle dogs. *Dent Traumatol* 2001;17(1):36-45.

Isidor F, Stockholm R. A case of progressive external root resorption treated with surgical exposure and composite restoration. *Endod Dent Traumatol* 1992;8(5):219-22.

Kayano T, Ochiai S, Kiyono K, Yamamoto H, Nakajima S, Mochizuki T. Effects of Er:YAG laser irradiation on human extracted teeth. *J Clin Laser Med Surg* 1991;17(3): 105-9.

Kimura Y, Wilder-Smith P, Matsumoto K. Lasers in endodontics: a review. *Int Endod J* 2000;33(3):173-85.

Kinirons MJ, Boyd DH, Gregg TA. Inflammatory and replacement resorption in reimplanted permanent incisor teeth: a study of the characteristics of 84 teeth. *Endod Dent Traumatol* 1999;15(6):269-72.

Kreisler M, Al Haj H, Daublander M, Gotz H, Duschner H, Willershausen B, et al. Effect of diode laser irradiation on root surfaces *in vitro*. *J Clin Laser Med Surg*. 2002;20(2):63-9.

Kreisler M, Kohnen W, Beck M, Haj HA, Christoffers AB, Götz H. Efficacy of NaOCl/H₂O₂ irrigation and GaAlAs laser in decontamination of root canals *in vitro*. *Lasers Surg Med* 2003;32(3):189-96.

Kreisler M, Meyer C, Stender E, Daublander M, Willershausen-Zonnchen B, d'Hoedt B. Effect of diode laser irradiation on the attachment rate of periodontal ligament cells: an *in vitro* study. *J Periodontol* 2001;72(10):1312-7.

Lage-Marques JLS, Malheiros CE, Amorim CVG. A endodontia e o MTA: uma abordagem clínica. In: 23^o CIOSP-Congresso internacional de Odontologia de São Paulo. São Paulo, 2005. cap 3, p.132-38.

Lage-Marques JLS. Avaliação dos efeitos da irradiação laser, utilizando Nd:YAG, CO₂ e Argônio no selamento dentinário e marginal de obturações retrógradas [Tese

de Livre-Docência]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 1997.

Laitala T, Väänänen K. Proton channel part of vacuolar H⁺-ATPase and carbonic anhydrase II expression is stimulated in resorbing osteoclast. *J Bone Min Res* 1993; 8(1):119-26.

Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a Mineral Trioxide Aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993;19(11):541-44.

Lengheden A, Blomlöf L, Lindskog S. Effect of immediate calcium hydroxide treatment and permanent root-filing on periodontal healing in contaminated replanted teeth. *Scand J Dent Res* 1991a Apr;99(2):139-46

Lengheden A, Blomlöf L, Lindskog S. Effect of delayed calcium hydroxide treatment on periodontal healing in contaminated replanted teeth. *Scand J Dent Res* 1991b;99(2):147-53.

Lengheden A. Influence of pH and calcium on growth and attachment of human fibroblasts in vitro. *Scand J Dent Res* 1994 Apr;102(2):130-6.

Levin L, Bryson EC, Caplan D, Trope M. Effect of topical alendronate on root resorption of dried replanted dog teeth. *Dent Traumatol* 2001;17(3):120-6.

Lindskog S, Blomlöf L, Hammarström L. Comparative effects of parathyroid hormone on osteoblasts and cementoblasts. *J Clin Periodontol* 1987;14(7):386-9.

Line SE, Polson AM, Zander HA. Relationship between periodontal injury, selective cell repopulation and ankylosis. *J Periodontol* 1974;45(10):725-30.

Main C, Mirzayan N, Shabahang S, Torabinejad M. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. *J Endod*. 2004;30(2):80-3.

Maldonado EP, Ribeiro MS, Zezell DM. Interação da luz laser com tecidos biológicos. [Apostila de Curso]. São Paulo: Mestrado Profissionalizante Laser em Odontologia - IPEN - FOUSP; 2000.

Manolagas S C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Re* 2000;21(2):115-37.

Massler M, Malone AJ. Root resorption in human permanent teeth. A roentnographicstudy. *Am J Orthod* 1954;40:619-33.

Mattar R, Mattar ECM. Traumatismo dentário: como tratar as reabsorções radiculares. In: *Anais do 15° Conclave Odontológico Internacional de Campinas* 2003 Mar/Abr;104.

Matt GD, Thorpe JR, Strother JM, McClanahan SB. Comparative study of white and gray mineral trioxide aggregate (MTA) simulating a one- or two-step apical barrier technique. *J Endod*. 2004;30(12):876-9.

Mc Nally K, Gillings B, Dawes J. Laser-dye ablation technique for removal of carius dentin and enamel. In: *Proceedings of the Lasers in Dentistry III*. SPIE; 1997;2973:62-73.

Mehl A, Folwaczny M, Haffner C, Hickel R. Bactericidal effects of 2.94 microns Er:YAG-laser radiation in dental root canals. *J Endod* 1999;25(7):490-3.

Mori G, Garcia RB. Estudo microscópico do efeito do tratamento da superfície radicular com acetazolamida em dentes de ratos avulsionados e reimplantados. *Rev Fac Odontol Bauru* 2002;10(3):180-5.

Mori GG. Estudo microscópico e morfométrico do efeito de substâncias anti-reabsortivas usadas como medicação intracanal em dentes de ratos avulsionados e reimplantados tardiamente [Tese de Doutorado] Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo; 2005.

Moritz A, Gutknecht N, Goharkhay K, Schoop U, Wernisch J, et al. *In vitro* irradiation of infected root canals with a diode laser: results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. *Quintessence Int* 1997a; 28(3):205-9.

Moritz A, Gutknecht N, Schoop U, Goharkay K, Doertbudak O, Sperr W. Irradiation of infected root canals with a diode laser in vivo: Results of microbiological examinations. *Lasers Surg Med* 1997b;21:221-6.

Moritz A, Schoop U, Goharkhay K, Jakolitsch S, Kluger W, Wernisch J. The bactericidal effect of Nd:YAG, Ho:YAG, and Er:YAG laser irradiation in the root canal: an *in vitro* comparison. J Clin Laser Med Surg 1999;17(4):161-4.

Ohmori Y, Hamilton TA. Cell type and stimulus specif regulation of chemokine gene expresson. Biochem Biophys Res Comum 1994;198:590-96.

Parirokh M, Asgary S, Eghbal MJ, Stowe S, Eslami B, Eskandarizade A, et al. A comparative study of white and grey mineral trioxide aggregate as pulp capping agents in dog's teeth. Dent Traumatol 2005;21(3):150-4.

Pécora JD, Brugnera Jr A, Cussioli AL, Zanin F, Silva R. Evaluation of dentin root canal permeability after instrumentation and Er:YAG laser application. Laser Surg Med 2000;26(3):277-81.

Pierce A, Berg JO, Lindskog S. Calcitonina as an alternative therapy in the treatment of root resorption. J Endod 1988;14(9):459-64.

Polson AM, Hanes PJ. Cell and fiber attachment to demineralized dentin. A comparison between normal and periodontitis-affected root surfaces J Clin Periodontol 1987;14(6):357-65.

Quinto JrJ. Estudo *in vitro* do esmalte dental irradiado com laser de diodo de alta potência em 960 nm: análise morfológica da superfície dental após irradiada e análise do comportamento térmico na câmara pulpar devido a aplicação do laser [Dissertação Mestrado Profissionalizante] SãoPaulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares / Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2001.

Radaelli CARM. Avaliação da redução bacteriana em conduto radicular infectado e irradiado com laser de diodo. Estudo *in vitro* [Dissertação Mestrado Profissionalizante] São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2002.

Raldi D, Miyagi SP, Lage-Marques JLS, Marques MM. Aderência celular e alterações estruturais em reabsorções radiculares após irradiação com lasers de alta potência. Braz Oral Res 2006;20 (Supl):217.

Raldi DP, Lage-Marques JLS. *In vitro* evaluation of the effects of the interaction between irrigating solutions, intracanal medication and Er:YAG laser in dentin permeability of the endodontic system. Pesqui Odontol Bras 2003;17(3):278-85.

Regalado DF, Canova GC, Menezes R, Oliveira RC, Brunini SHS. Análise da variação de pH entre cimentos MTA e Portland em diferentes períodos de tempo. *Braz Oral Res* 2002;17 (supl):229.

Remme JH, Blas E, Chitsulo L, Desjeux PM, Engers HD, Kanyok TP, et al. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. *Trends Parasitol* 2002;18(10):421-6.

Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Lasers in periodontics. *J Periodontol* 2002;73(10):1231-9.

Ribeiro DA, Matsumoto MA, Marques MEA, Salvadori DMF. *In vitro* biocompatibility tests of two commercial types of mineral trioxide aggregate. *Braz Oral Res* 2005; 19(3):183-87.

Ripamonti U, Reddi AH. Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8:154-63.

Rodan GA, Martin TJ. Role of the osteoblasts in hormonal control of bone resorption- a hypothesis. *Calcif Tissue Res* 1981;33:349-51.

Romanos G, Nentwig GH. Diode laser (980 nm) in oral and maxillofacial surgical procedures: clinical observations based on clinical applications. *J Clin Laser Med Surg* 1999;17(5):193-7.

Sant'Ana ACP. Efeitos da aplicação de diferentes fatores de crescimento (PDGF-BB, IGF-1E e TGB β 1) isolados ou combinados na taxa de proliferação e na adesão de fibroblastos derivados de ligamento periodontal humano a fragmentos radiculares tratados ou não com ácido cítrico e tetraciclina após a raspagem [Tese Doutorado]. Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo; 2001.

Sasaki KM, Aoki A, Shikuzo I, Ishikawa I. Morphological analysis of cementum and root dentin after Er:YAG laser irradiation. *Lasers Surg Med* 2002;31(2):79-85.

Scherer W, Dragoo MR. New subgingival restorative procedures with Geristore resin ionomer. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1995;7(1 Suppl):1-4.

Schoop U, Moritz A, Kluger W, Maleschitz P, Goharkhay K, Schöfer C, et al. Changes in root surface morphology and fibroblast adherence after Er:YAG laser irradiation. *J Laser Appl* 2001;2(2):83-93.

Soares IJ, Goldberg F. Endodontia: Técnica e Fundamentos. Porto Alegre: Ed. Artmed; 2001.

Soares IJ. Etiologia das reabsorções dentárias. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN Endodontia Trauma. São Paulo: Artes Médicas, 2002. cap.19, p.409-43.

St George G, Darbar U, Thomas G. Inflammatory external root resorption following surgical treatment for intra-bony defects: a report of two cases involving Emdogain and a review of the literature. *J Clin Periodontol* 2006;33(6):449-54.

Stern RH, Sognnaes RF. Laser beam on dental hard tissues. In: *J Dent Res* 1964; 43(5): 873 (Res 307).

Takamori ER. Estudo *in vitro* da citotoxicidade do osso bovino misto quimicamente tratado [Dissertação de Mestrado]. Universidade Estadual de Campinas; 2004.

Takeda FH, Harashima T, Kimura Y, Matsumoto K. Efficacy of Er:YAG laser irradiation in removing debris and *smear layer* on root canal walls. *J Endod* 1998;24(8):548-51.

Tanji EY, Matsumoto K, Eduardo CP. Scanning electron microscopic observations of dentin surface conditioned with Er:YAG laser. *D G L Newsletter* 1997; 8(11):8.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289 (5484):1504-8.

Tewfik HM, Garnick JJ, Schuster GS, Sharawy MM. Structural and functional changes of cementum surface following exposure to a modified Nd:YAG laser. *J Periodontol* 1994;65(4):297-302.

Theodoro LH, Haypek P, Bachmann L, Garcia VG, Sampaio JE, Zezell DM, et al. Effect of Er:YAG and diode laser irradiation on the root surface: morphological and thermal analysis. *J Periodontol* 2003;74(6):838-43.

Theodoro LH. Ação do laser de Er:YAG e de diodo na adesão de elementos sangüíneos e na morfologia de superfícies radiculares irradiadas. Estudo através de

microscopia eletrônica de varredura [Tese Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista; 2003.

Thomas D, Rapley J, Cobb C, Spencer P, Killoy W. Effects of the Nd:YAG laser and combined treatments on *in vitro* fibroblast attachment to root surfaces. J Clin Periodontol 1994;21(1):38-45.

Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. J Endod 1995;21(7):349-53.

Toure YT, Zicker F, Morel CM. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. Trends Parasitol. 2002;18(10):421-6.

Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. PH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hidroxide. J Endod 1981;7(1):17-21.

Trope M, Chivian N. Root resorption. In: Cohen S, Burns CR. Pathways of the pulp Saint Louis:Ed. Mosby, 2002.

Trope M, Yesilsoy C, Koren L, Moshonov J, Friedman S. Effect of different endodontic treatment protocols on periodontal repair and root resorption of replanted dog teeth. J Endod 1992;18(10):492-6.

Vanderas AP. Effects of intracanal medicaments on inflammatory resorption or occurrence of ankylosis in mature traumatized teeth: a review. Endod Dent Traumatol 1993;9(5):175-84.

White JrC. Repair of a root resorption lesion. A case report. J Periodontol 1998;69(5):596-600.

White JrC, Bryant N. Combined therapy of mineral trioxide aggregate and guided tissue regeneration in the treatment of external root resorption and an associated osseous defect. J Periodontol 2002;73(12):1517-21.

Woodyard SG, Snyder AJ, Henley G, O'Neal RB. A histometric evaluation of the effect of citric acid preparation upon healing of coronally positioned flaps in nonhuman primate J Periodontol 1984;55(4):203-12.

Yamaguchi H, Kobayashi K, Osada R, Sakuraba E, Nomura T, Arai T, et al. Effects of irradiation of an erbium:YAG laser on root surfaces. J Periodontol 1997;68(12):1151-5.

Zervas P, Lambrianidis T, Karabouta-Vulgaropoulou I. The effect of citric acid treatment on periodontal healing after replantation of permanent teeth. Int Endod J 1991;24(6):317-25.

Zharikov EV, Zhecov VI, Kulevskii LA, Murina TM, Osiko VV, Prokhorov AM, et al. Stimulated emission from Er^{3+} ions in yttrium aluminum garnet crystals at $[\lambda] = 2.94 \mu$. Sov J Quantum Electron 1975; 4:1039-40.

APÊNDICES

Parâmetros - Laser Er:YAG

- **Emissor Er:YAG** (KaVo Key Laser, KaVo, Alemanha)
 - **Comprimento de onda:** 2,94 μm
 - **Duração de pulso variável entre :** 250 e 500 μs
 - **Laser pulsado:** focalizado
 - **Forma de aplicação:** laser com contato - movimentos de varredura
 - **Peça de mão:** 2055
 - **fibra óptica:** diâmetro de 375 μm - posicionada num ângulo de 90° em relação a área irradiada
 - **Fator de transmissão:** 0,42 (dado pelo fabricante)
 - **Potência:** 0,42 W
Energia/ pulso (Em): 100 mJ (monitor) - 42 mJ (transmitida ou na saída da fibra)
 - **Área irradiada:** 7,065 mm
(diâmetro da broca = 3mm/área circunferência = $\pi \times R^2 = 3,14 \times 1,5^2$)
 - **Frequência:** 10 Hz
 - **Tempo de exposição:** 10 s
 - **Número de pulsos:** 100 (n° de pulsos = frequência x tempo = 10×10)
 - **Fluência:** 38,045J / cm^2 (= Energia de saída/ área da fibra óptica)
 - **Área da fibra óptica:** 0,00011039 cm^2 (= $\pi \times R^2 = 3,14 \times 0,01875$)
 $R = \text{diâmetro da fibra}/2 = 0,0375/2$
 - **Sistema de refrigeração:** nenhum (as superfícies radiculares, no momento da irradiação, estavam umedecidas com água destilada)
-

Parâmetros Laser de Diodo

- **Emissor AsGaAl** (Soft Lase, Zap Laser,Pleasant Hill, Califórnia,USA)
 - **Comprimento de onda:** 808 nm $\pm$ 5 nm
 - **Duração de pulso:** 0,05 ms
 - **Modo de operação:** contínuo
 - **Forma de aplicação:** laser sem contato – movimento de varredura (0,5 mm da superfície)
 - **Fibra óptica:** diâmetro de 400 μ m, posicionada num ângulo de 90° em relação a área irradiada
 - **Potência:** 1,2 W (monitor) e 1,0 W (na saída da fibra) - a potência de foi determinada por meio de um aparelho medidor de potência.

 - **Energia/ pulso (Em):** 100 mJ ($E_m = n^\circ \text{ de pulsos} / \text{Freqüência} = 100/1 = 100 \text{ mJ}$)
 - **Área irradiada:** 7,065 mm²
(diâmetro da broca = 3mm / área circunferência = $\pi \times R^2 = 3,14 \times 1,5^2$)
 - **Freqüência:** 10 Hz
 - **Tempo de exposição:** 10 s
 - **Número de pulsos:** 100 ($n^\circ \text{ de pulsos} = \text{freqüência} \times \text{tempo} = 10 \times 10$)
 - **Intensidade de potência:** 796 W/cm² (= potência de saída da fibra/ área da ponta da fibra)
 - **Fluência:** 79,6 J/cm²
 - **Energia total:** 10J ($\text{energia total} = E_m \times n^\circ \text{ de pulsos} = 100 \times 100 = 10000 \text{ mJ}$)
 - **Sistema de refrigeração:** ausente
-

APÊNDICE C- Resultados originais da análise estatística da adesão celular nos diferentes grupos experimentais, pelo teste ANOVA (nível de significância 5%), realizado pelo programa estatístico GraphPad InStat Versão 3.0

Comparison	Mean difference	q	p value
Er X Diodo	44.667	6.441	*** P<0.001
Er X Ca /Er	230.75	33.273	*** P<0.001
Er X Ca/Di	200.17	28.863	*** P<0.001
Er X MTA/Er	124.33	17.928	*** P<0.001
Er X MTA/Di	137.00	19.755	*** P<0.001
Er X Ca	245.58	35.412	*** P<0.001
Er X MTA	116.33	16.775	*** P<0.001
Er X Control	86.167	12.425	*** P<0.001
Diodo X Ca /Er	186.08	26.832	*** P<0.001
Diodo X Ca/Di	155.50	22.422	*** P<0.001
Diodo X MTA/Er	79.667	11.487	*** P<0.001
Diodo X MTA/Di	92.333	13.314	*** P<0.001
Diodo X Ca	200.92	28.971	*** P<0.001
Diodo X MTA	71.667	0.334	*** P<0.001
Diodo X Control	41.500	5.984	*** P<0.01
Ca /Er X Ca/Di	-30.583	4.410	ns P>0.05
Ca /Er X MTA/Er	-106.42	15.345	*** P<0.001
Ca /Er X MTA/Di	-93.750	13.518	*** P<0.001
Ca /Er X Ca	14.833	2.139	ns P>0.05
Ca /Er X MTA	-114.42	16.498	*** P<0.001
Ca /Er X Control	-144.58	20.848	*** P<0.001
Ca/Di X MTA/Er	-75.833	10.935	*** P<0.001
Ca/Di X MTA/Di	-63.167	9.108	*** P<0.001
Ca/Di X Ca	45.417	6.549	*** P<0.001
Ca/Di X MTA	-83.833	12.088	*** P<0.001
Ca/Di X Control	-114.00	16.438	*** P<0.001
MTA/Er X MTA/Di	12.667	1.826	ns P>0.05
MTA/Er X Ca	121.25	17.484	*** P<0.001
MTA/Er X MTA	-8.000	1.154	ns P>0.05
MTA/Er X Control	-38.167	5.503	*** P<0.01
MTA/Di X Ca	108.58	15.657	*** P<0.001
MTA/Di X MTA	-20.667	2.980	ns P>0.05
MTA/Di X Control	-50.833	7.330	*** P<0.001
Ca X MTA	-129.25	18.637	*** P<0.001
Ca X Control	-159.42	22.987	*** P<0.001
MTA X Control	-30.167	4.350	ns P>0.05

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test.

If the value of q is greater than 4.495 then the P value is less than 0.05.

▪ One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001 , considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

▪ Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.495 then the P value is less than 0.05.

▪ Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
=====	=====	=====	=====
Er:YAG	0.2663	>0.10	Yes
Diodo	0.1383	>0.10	Yes
Ca+Er	0.3303	>0.10	Yes
Ca+Diod	0.2655	>0.10	Yes
MTA+ Er	0.1918	>0.10	Yes
MTA+Dio	0.1530	>0.10	Yes
CaOH2	0.2384	>0.10	Yes
MTA	0.1390	>0.10	Yes
Control	0.1767	>0.10	Yes

▪ **Intermediate calculations. ANOVA table**

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
=====	=====	=====	=====
Treatments (between columns)	8	661483	82685
Residuals (within columns)	100	57620	576.20
-----	-----	-----	-----
Total	108	719103	

$$F = 143.50 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$$

ANEXO

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 200/05

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa *"Estudo dos efeitos da irradiação com lasers de alta potência e materiais de uso endodôntico em reabsorções radiculares externas simuladas"*, de responsabilidade da Pesquisadora **Denise Pontes Raldi**, sob orientação do Professor Doutor **José Luiz Lage-Marques**.

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, 07 de dezembro de 2005

Prof. Dr. Rogério Nogueira de Oliveira
Coordenador do CEP-FOUSP