**AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE TERAPIAS
RADICULARES PERIODONTAIS COM LASER DE ER:YAG E
CONVENCIONAIS, A PARTIR DA REAÇÃO DO TECIDO
SUBCUTÂNEO DE RATOS E DA TOPOGRAFIA SUPERFICIAL,
UTILIZANDO FRAGMENTOS DE RAÍZES DENTAIS HUMANAS
COMPROMETIDAS PERIODONTALMENTE.**

ERIC JACOMINO FRANCO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru, da Universidade de
São Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Odontologia, área de Periodontia

(Edição Revisada)

Bauru
2002

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE TERAPIAS
RADICULARES PERIODONTAIS COM LASER DE ER:YAG E
CONVENCIONAIS, A PARTIR DA REAÇÃO DO TECIDO
SUBCUTÂNEO DE RATOS E DA TOPOGRAFIA SUPERFICIAL,
UTILIZANDO FRAGMENTOS DE RAÍZES DENTAIS HUMANAS
COMPROMETIDAS PERIODONTALMENTE.**

ERIC JACOMINO FRANCO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru, da Universidade de
São Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Odontologia, área de Periodontia

(Edição Revisada)

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar
Gregghi

Bauru
2002

F848a Franco, Eric Jacomino
Avaliação comparativa entre terapias radiculares periodontais com laser de Er:YAG e convencionais, a partir da reação do tecido subcutâneo de ratos e da topografia superficial, utilizando fragmentos de raízes dentais humanas comprometidas periodontalmente./ Eric Jacomino Franco, 2002
133p.: il. ; 30cm.

Dissertação. (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. USP.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Gregghi

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP na reunião do dia 31/05/2001.

ERIC JACOMINO FRANCO

08 de junho de 1977
Bauru/ SP

Nascimento

1995 – 1998

Curso de Odontologia na
Universidade do Sagrado Coração-
Bauru/SP.

1999

Aperfeiçoamento em Periodontia no
Instituto de Ensino Odontológico.
Extensão Universitária em Cirurgia e
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da
Universidade do Sagrado Coração.

2000

Aprimoramento em Periodontia na
área Reabilitadora do Hospital de
Reabilitação de Anomalias
Craniofaciais – USP (FUNDAP).

2001-2003

Curso de Pós-Graduação em
Periodontia ao nível de Mestrado, na
Faculdade de Odontologia de Bauru
da Universidade de São Paulo.

Associações

APCD – Associação Paulista de
Cirurgiões Dentistas.
SBPqO – Sociedade Brasileira de
Pesquisa Odontológica.

“A mente que se
abre a uma
nova idéia,
jama^{is} ~~voltará~~ ^{deixará}
ao^{iv} seu tamanho
original.”

DEDICATÓRIA

A Deus: “Obrigado Senhor, pelo Dom da vida, por esta etapa vencida, por meu passado e meu futuro. Concede-me serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso mudar, coragem para mudar aquelas que posso e sabedoria para distinguir umas das outras.”

Aos meus pais Eduardo e Regina que revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação. Cultivaram na criança todos os valores que a transformaram num adulto responsável e consciente. Abriram as portas do meu futuro iluminando meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar: O estudo. Através dos seus exemplos pude crer que com determinação e amor posso transformar os meus desejos em algo concreto. Obrigado por tudo.

A Angélica, meu amor, companheira e amiga. Em você encontrei a tranquilidade necessária para viver feliz. Agradeço seu incentivo, compreensão e otimismo em mais esta conquista.

Ao meu irmão Eduardo pelo incentivo e companheirismo nesses anos, pelos obstáculos enfrentados juntos e pela vitória conquistada.

A minha avó Jandyra, pelo exemplo de luta e determinação. Sua vivacidade incentiva a todos que a cercam.

A família e aos amigos que sempre depositaram confiança no meu crescimento, apoiando de forma preciosa os meus anseios.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Gregghi, pela destreza com que conduziu a orientação deste trabalho, pela dedicação de Mestre e incentivador desde a fase inicial desta pesquisa. Minha sincera gratidão.

Ao Prof. Dr. Gérson Francisco de Assis pela dedicação e atenção destinadas neste trabalho, me guiando nos momentos de dificuldades e colaborando com seus conhecimentos.

As biólogas Tânia e Daniele pelas inesquecíveis horas de convívio no laboratório de Histologia da FOB- USP. Agradeço imensamente pelos ensinamentos que vocês me transmitiram.

A Prof.^a Cláudia Almeida Prado P. Sgaviolli e ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Francischone pela atenção dispensada na execução de parte deste trabalho no Centro de Estudos do Laser da Universidade do Sagrado Coração.

Ao Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo, pela gentileza e atenção destinadas à minha formação e credenciamento na área de Laser em Odontologia, no Laboratório Experimental de Laser em Odontologia- LELO, da Faculdade de Odontologia de São Paulo- FO-USP.

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima, pelos ensinamentos e atenção dispensados na realização das análises em microscopia eletrônica de varredura. (ESALQ- USP/ Piracicaba)

Aos amigos Stefano e Carla e ao meu irmão Eduardo, pela contribuição direta na fase experimental deste trabalho. Agradeço imensamente.

Ao Prof. Ms. José Roberto Pereira Lauris, pela realização da análise estatística deste trabalho.

A Mariane pela gentileza com que se prestou na revisão do abstract.

Ao Prof. Dr. Euloir Passanezi pelos ensinamentos preciosos na minha formação de Mestre em Periodontia.

Ao Prof. Dr. Deoclécio Nahás (*in memorian*), orientador inicial deste trabalho e que infelizmente não pode vê-lo concretizar-se.

Aos colegas de mestrado: Caio, Carla, Dioracy, Marcio, Mariana, Milena e Stefano, pelo convívio inesquecível nesta fase da minha vida.

Aos funcionários da Periodontia : Ivânia, Edilaine, Neusa e Marcos pela compreensão e atenção com que sempre me trataram, pela convivência nesses anos. Agradeço profundamente.

Aos colegas estagiários: Aline, Celene, Danilo, Juliana, Patrícia e Rodrigo pelos convívio tranqüilo que tivemos neste período.

Aos Professores da Universidade do Sagrado Coração pelo incentivo e pelos conhecimentos fundamentais da minha formação acadêmica.

As Prof.^{as} Sueli e Andréa pelo incentivo no ingresso à carreira acadêmica, pela confiança a mim destinada e pelos ensinamentos nos bons tempos de Centrinho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
RESUMO	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISTA DA LITERATURA	8
2.1 Tratamentos com Laser	9
2.1.1 Histórico	9
2.1.2 Laser e Periodontia	10
2.2 Tratamentos Radiculares Convencionais	28
3 PROPOSIÇÃO	53
4 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 Seleção dos dentes	56
4.2 Preparação dos fragmentos	56
4.3 Laser de Érbio	57
4.4 Grupos Experimentais	58
4.5 Implantação dos fragmentos em tecido subcutâneo de ratos	61
4.6 Processamento do material	62
4.7 Análise Histológica e Morfométrica	63
4.8 Casualização dos Campos	64
4.9 Teste de Homogeneidade da amostra	66
4.10 Avaliação da densidade de volume e do número de células por mm ²	67
4.11 Análise Estatística	67
4.12 Análise das superfícies radiculares em Microscopia Eletrônica de Varredura. (MEV)	68
5 RESULTADOS	70
5.1 Análise Histológica (Microscopia óptica)	71
5.1.1 Período de 7 dias	71
5.1.2 Período de 14 dias	77
5.1.3 Período de 28 dias	83
5.2 Análise Morfométrica	87
5.2.1 Teste de Homogeneidade da amostra	87
5.2.2 Densidade de volume e o número de células por mm ²	88
5.3 Análise de Superfície em Microscopia Eletrônica de Varredura	94
6 DISCUSSÃO	100
6.1 Sobre a metodologia empregada	101
6.2 Sobre os Resultados obtidos	107
7 CONCLUSÕES	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
ABSTRACT	133

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μm – Micrômetro

μm^2 – Micrômetro quadrado

$^{\circ}\text{C}$ – Grau Celsius

$\text{\AA}$ – Angstrom

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

Er: YAG – Laser de Érbio : Ítrio-Alumínio-Granada

g – Grama

Hz – Hertz

J – Joule

J/cm^2 – Joules por centímetro quadrado

Laser - *light amplification by stimulated emission of radiation*

M – Molar

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

mJ – Milijoule

ml – Mililitro

mm – Milímetro

mm^2 - Milímetro quadrado

Nd:YAG – Laser de Neodímio : Ítrio-Alumínio-Granada

pH – Potencial de hidrogênio

pps – Pulsos por segundo

s – Segundos

RESUMO

O uso do laser de Er:YAG têm sido proposto como uma alternativa ou adjunto à terapia mecânica radicular periodontal. Entretanto, a influência da irradiação deste laser nas superfícies radiculares ainda não está totalmente clara. Com o objetivo de avaliar as possíveis alterações ocorridas na superfície radicular irradiada com o laser de Er:YAG, utilizou-se a avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e paralelamente a resposta tecidual decorrente da implantação de fragmentos radiculares, em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, por períodos de 7, 14 e 28 dias, comparado com terapias convencionais. Os grupos de tratamento foram: grupo 1- laser de Er:YAG com 60mJ, 10pps, por 15 s. ; grupo 2- laser de Er:YAG com 100mJ, 10pps, por 15 s. ; grupo 3- raspagem e alisamento radicular e aplicação de ácido cítrico com tetraciclina, por 3 min. e grupo 4- raspagem e alisamento radicular. Os resultados das análises histológica e morfométrica mostraram maior número de células inflamatórias, no grupo 4, no período de 7 dias, comparado aos demais grupos. Observou-se fibras colágenas aderidas as superfícies radiculares nos grupos 1, 2 e 3, indicando maior biocompatibilidade comparado ao grupo 4, que demonstrou característica de encapsulamento fibroso. A análise em MEV mostrou a presença de pequenas crateras características do processo de ablação pelo laser. Essas irregularidades podem favorecer a adesão da fibrina, nos estágios iniciais da cicatrização, facilitando a inserção de fibras nessas superfícies. Os protocolos utilizados neste trabalho demonstraram resultados favoráveis, sendo que o laser de Er:YAG pode representar uma alternativa na terapia radicular periodontal.

INTRODUÇÃO *

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal tem como fator etiológico primário a placa dentobacteriana. Eficientes mecanismos de adesão à superfície dentária promovem uma colonização harmoniosa e muito bem organizada de vários tipos de microorganismos, aumentando a resistência bacteriana aos fatores de defesa do hospedeiro ¹⁰⁰.

A presença das endotoxinas que invadem os tecidos periodontais pode constituir uma fonte de toxicidade, quando fixados no cimento radicular, favorecendo a destruição progressiva das estruturas do periodonto de sustentação ^{2,3,100}.

A possibilidade de que os lipopolissacarídeos fossem os responsáveis pela citotoxicidade do cimento periodontalmente comprometido foi proposta por HATFIELD;BAUMHAMMERS ⁴⁰, em 1971. Nesta época era recomendada a completa remoção de todo o cimento exposto, como procedimento chave para o sucesso da terapia periodontal. Não havia comprovação da quantidade de cimento que precisaria ser removido para assegurar um bom resultado do tratamento periodontal. Este conceito baseou-se em resultados de estudos que demonstraram a presença de produtos citotóxicos de origem bacteriana no cimento ^{1,4,5,18,26,40,48,99}, produtos esses nocivos à cicatrização, por causarem degradação das fibras colágenas.⁹⁷ Além disso, elementos citotóxicos foram detectados entre 40 e 50 µm mais externos da superfície radicular ⁹⁸.

Com relação à invasão bacteriana no cimento, SOTTOSANTI; GARRET ¹⁰¹, em 1975, observaram que a penetração de bactérias ocorria até 12 µm abaixo do cimento coberto por placa, em forma de pequenos grupos de bactérias gram-positivas e gram-negativas, na ausência de

qualquer defeito de superfície, dentro do terço mais externo dos túbulos dentinários. Já ADRIAENS et al.^{2,3}, 1988, relataram invasão bacteriana até mesmo na superfície pré-dentinária da parede pulpar e nos 300 µm mais externos do cimento após a raspagem.

Por outro lado, HUGHES; SMALES⁴⁵, 1986; HUGHES et al., 1988⁴⁶, demonstraram, através de técnicas imuno-histoquímicas, que os lipopolissacarídeos estavam presentes apenas na superfície do cimento exposto à bolsa periodontal. Também através de técnicas de imunofluorescência direta e autorradiografia, verificaram que a endotoxina aderiu à superfície dental sem penetrar no cimento, tanto em dentes doentes quanto em dentes saudáveis, e que esta união parecia ser fraca⁶⁷.

MOORE et al.⁶⁴ (1986) observaram que métodos suaves, como lavagem em água durante um minuto ou a utilização de uma escova montada em baixa rotação também por um minuto, removeram 99% dos lipopolissacarídeos da superfície dental. Entretanto, a superfície radicular exposta ao meio bucal pela progressão da doença periodontal inflamatória, de uma forma ou de outra, pode dificultar a receptividade dos tecidos periodontais⁷⁶.

POLSON; CATON⁷⁶ (1982) observaram que a contaminação da superfície radicular constitui um fator importante capaz de interferir na regeneração periodontal, muito mais do que o próprio sítio de inflamação.

A busca de soluções para o problema, com o tratamento mecânico radicular, que visa a remoção dos agentes etiológicos locais através da utilização de instrumentos manuais, rotatórios ou ultrassônicos, bem como o emprego de métodos alternativos, como a aplicação de agentes ácidos e quelantes, tentam viabilizar o processo de reinserção, evitando a formação

de um epitélio juncional longo como resultado final do tratamento periodontal.

A utilização da terapia mecânica radicular em Periodontia não visa apenas a remoção de cálculo e placa bacteriana, mas também a eliminação de cemento deteriorado e/ou contaminado pelas bactérias e seus produtos, propiciando superfícies radiculares biologicamente aceitáveis, redução da inflamação, redução da profundidade de sondagem, facilidade nos procedimentos de higiene bucal, melhora e manutenção de níveis de inserção e preparo dos tecidos para os procedimentos cirúrgicos, visando o restabelecimento da saúde dos tecidos periodontais ⁶⁹. Entretanto, esses métodos muitas vezes não são efetivos na remoção de depósitos mineralizados em áreas de difícil acesso, como bolsas profundas, concavidades radiculares e áreas de furca.

O emprego de métodos alternativos, como o condicionamento radicular através da aplicação de soluções ácidas ou quelantes, foi introduzido como um procedimento periodontal visando, de modo geral, desintoxicar qualquer remanescente da contaminação da superfície radicular após a raspagem e alisamento radicular, tornando-a mais biocompatível ^{37,75,80}. Além disso, parece promover também: a remoção da camada de *smear layer* produzida pela instrumentação radicular ^{36,75}; a abertura dos túbulos dentinários, expondo a matriz colágena e permitindo a união entre as fibrilas expostas da superfície radicular e as fibrilas colágenas do tecido gengival ^{80,88}; o favorecimento da adesão da fi bronectina nos estágios iniciais da cicatrização, inibindo a migração apical do epitélio juncional ^{81,49}; o favorecimento da quimiotaxia, migração e adesão de fibroblastos ^{19,107}; a eliminação de endotoxinas da superfície radicular ²⁸; o efeito

antimicrobiano²⁶; a descalcificação de cálculo residual¹⁰⁴ e a cementogênese⁸⁷.

Atualmente, um novo método alternativo em potencial surgiu com os estudos publicados na área dos lasers.

O termo laser é uma abreviatura de *light amplification by stimulated emission of radiation*, ou seja, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Em 1960 MAINMAN utilizou um cristal de rubi e uma lâmpada fotográfica para produzir a primeira luz laser emitido no espectro visível⁵⁷. A partir desta descoberta, muitos estudos foram realizados^{34,72}, havendo uma crescente utilização dos lasers, principalmente na medicina¹⁵. A utilização no campo odontológico iniciou-se em 1964, através de um estudo feito por STERN e SOGNAES, com o laser de rubi aplicado em esmalte e dentina¹⁰³. A partir daí, diversas pesquisas utilizando diferentes comprimentos de onda foram realizadas e continuam atualmente^{42,43}. A aplicação dos lasers, na odontologia, já é feita em diferentes especialidades^{20,61,62,113}.

Existem diversos tipos de lasers que podem ser classificados de acordo com a potência de emissão: os lasers operando em baixas potências e lasers com altas potências. Os lasers de He-Ne e o Ar-Ga-Al, por exemplo, operam com baixas potências e possuem um efeito eminentemente analgésico, antiinflamatório e bioestimulante, sendo utilizados nos casos de aftas, herpes labial, queilite angular, trismos, parestesias, hipersensibilidade dentinária, pós-cirurgias, pós-intervenções endodônticas^{61,115}.

Os principais lasers que operam em alta potência são: o de Argônio, Neodímio (Nd:YAG), Dióxido de Carbono (CO₂), Lasers Exímeros e o de Érbio (Er:YAG), que possuem, de forma geral, efeitos de corte e

coagulação. Estes lasers com alta potência podem ser indicados na prevenção de cáries, no tratamento da hipersensibilidade dentinária, limpeza e selamento de fósulas e fissuras, na remoção da porcentagem final de tecido cariado, na gengivectomia, gengivoplastia, frenectomia, no tratamento de herpes labial e aftas e para obtenção de redução microbiana no interior dos canais radiculares, apicectomias e preparos cavitários e também no selamento dos túbulos dentinários^{20,22,25,50,58,59,61,62,105,112}.

Os lasers com alta potência mostraram uma excelente capacidade de ablação em tecidos moles, acompanhados de um efeito hemostático adequado. Por isso, esses lasers foram aprovados para utilização em tecidos moles na periodontia e em cirurgias orais^{73,112}. Embora o uso dos sistemas de laser na periodontia envolva mais especificamente procedimentos em tecido mole, como a gengivectomia e frenectomia^{13,61,108,110}, a aplicação do laser em tecidos duros, como a superfície radicular ou osso alveolar, tem sido referendada na literatura^{9,10,13,27,29,30,32,42,43,51,60,63,106,109,114}. Os lasers de CO₂ e Nd:YAG não apresentam efetividade quando do tratamento em tecidos duros, tais como a superfície radicular ou o osso alveolar, devido aos efeitos térmicos indesejáveis, como a carbonização tecidual e danos térmicos nos tecidos adjacentes⁹¹.

Recentemente o laser de Er:YAG foi desenvolvido para o uso na odontologia, devido a excelente capacidade de ablação de tecidos duros, sem promover danos térmicos locais, como demonstrado em alguns estudos^{8,85,113}. Devido às características vantajosas, como a ablação ou vaporização, hemostasia e efeito esterilizante^{89,113}, o tratamento com laser de Er:YAG tem sido proposto como uma alternativa ou adjunto ao tratamento

convencional, na terapia mecânica radicular periodontal ^{7,9,10,13,29,30,110}. Entretanto, a influência da irradiação do laser de Er:YAG nas superfícies radiculares ainda não está totalmente clara ^{9,29,30}, bem como a resposta tecidual frente a esse tipo de tratamento. Diante desse fato, as pesquisas atuais têm-se voltado à análise da textura da superfície radicular, após irradiação do laser, utilizando principalmente a microscopia eletrônica de varredura ^{9,10,29,30,32,114}, bem como avaliado as alterações causadas por diferentes níveis de energia do laser de Er:YAG ²⁹.

A indicação crescente do laser de Er:YAG para o tratamento de superfícies radiculares, no sentido de promover a eliminação de cálculos, sem causar danos estruturais em cimento e/ou dentina e de favorecer a resposta biológica a esse tipo de tratamento, devido ao efeito esterilizante, tem merecido destaque na literatura específica, por constituir um método alternativo na terapia mecânica radicular periodontal, tanto durante o preparo inicial quanto durante a fase cirúrgica. Entretanto, existe carência de trabalhos que posicionem a real influência da irradiação do laser de Er:YAG no tratamento das superfícies radiculares. Desta forma, o presente trabalho avaliou a influência do tratamento com laser de Er:YAG nas superfícies radiculares de dentes periodontalmente comprometidos, tendo como parâmetro o método convencional de raspagem e alisamento radicular e condicionamento com solução ácida, utilizando como referencial a avaliação da textura superficial, por meio de microscopia eletrônica de varredura e da resposta tecidual decorrente da implantação, em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, de fragmentos submetidos aos tratamentos determinados.

REVISTA DA LITERATURA *

2 REVISTA DA LITERATURA

Visando permitir uma exposição mais clara e objetiva da literatura, optou-se pela divisão dos trabalhos em relação aos tipos de tratamentos:

2.1 Tratamentos com Laser

2.1.1 Histórico

“Em 1916, Albert Einstein postulou através de demonstrações matemáticas o processo de estimulação de porções do campo eletromagnético e produção de luz amplificada”.(citado por CECCINI ²², 1995) O cientista holandês Neils Bohr postulou que os átomos poderiam residir em mais de um estado energético, e que quando um átomo, ao mudar de um estado energético para outro, ocorreria absorção ou a emissão de um quantum de energia luminosa. Estes princípios guiaram o desenvolvimento do laser, principalmente no início dos anos 50, com o trabalho de SCHAWLOW; TOWNES ⁹⁵, em 1958. Estes autores foram capazes de amplificar com sucesso as frequências de microondas, processo esse denominado de MASER. Também sugeriram a extensão dos princípios maser para a porção visível do espectro eletromagnético.

Em 1960 MAINMAN ⁵⁷ utilizou um cristal de rubi como meio ativo, que foi estimulado com intensos pulsos luminosos e obteve uma emissão estimulada de radiação, no espectro visível.

Em 1961 JAVAN et al. (citado por PINHEIRO⁷⁴,1995), desenvolveram o laser de Hélio-Neônio. Após alguns anos, PATEL et al.⁷² desenvolveram o laser de dióxido de carbono, operando no infravermelho.

Em 1964 STERN; SOGNAES³⁴ e em 1965 GOLDMAN et al.¹⁰³, publicaram as primeiras aplicações do laser de rubi em tecidos dentais duros.

A utilização dos lasers na odontologia, mais especificamente nas cirurgias como remoção de lesões e tumores da cavidade oral, passaram a ser possíveis com o laser de rubi, argônio, Nd:YAG e dióxido de carbono^{61,62,113}.

Em 1989 HIBST; KELLER^{42,43}, demonstraram o efeito produzido pelo laser de Er:YAG sobre os tecidos dentais duros. De acordo com KELLER; HIBST⁵¹ em 1992, o laser de Er:YAG mostrou-se efetivo na realização de osteotomias e apicectomias. KUMAZAKI⁵², em 1992, relatou a efetividade do laser de Er:YAG, quando comparada ao condicionamento ácido promovido pelo ácido fosfórico na superfície do esmalte e dentina.

2.1.2 Laser e Periodontia

A possibilidade do emprego do laser de Er:YAG, assim como outros lasers de alta densidade de potência, na terapia periodontal, iniciou-se com os estudos de AOKI et al.¹⁰, em 1994. A partir deste trabalho, outros autores com metodologias diversificadas passaram a estudar os efeitos destes lasers na superfície radicular^{7,13,29,30,31,47,60,96,106,109,110,114}. Nota-se que a maioria dos trabalhos existentes nessa área foram empregados “in vitro”.

Entretanto alguns trabalhos clínicos estão sendo publicados mais recentemente, graças à realização destes primeiros estudos, que foram fundamentais para a determinação de parâmetros e protocolos de uso desses lasers.

O trabalho de AOKI et al.¹⁰ (1994), consistiu da aplicação do laser de Er:YAG, visando a eliminação de cálculos em dentes humanos extraídos, utilizando diferentes níveis de energia (de 10 à 120 mJ/pulso) e pulso de repetição de 10 pps. As alterações morfológicas e eficiência do tratamento com laser foram observadas através de microscopia eletrônica de varredura. Num segundo experimento avaliou-se o tratamento com o laser de Er:YAG, com um nível de energia de 30 mJ/pulso e 10 pps, quanto as alterações morfológicas, a eficiência e as alterações térmicas utilizando-se o laser com e sem irrigação por água. Observou-se efetividade na remoção de cálculos, quando utilizado sob irrigação com água, ocorrendo um pequeno aumento da temperatura da superfície radicular durante o tratamento com laser. Os autores sugeriram a possibilidade deste tipo de laser ser utilizado futuramente em raspagens subgengivais.

ANDO et al.⁷, em 1996, examinaram o efeito bactericida do laser de Er:YAG nas bactérias periodontopatogênicas em um estudo “in vitro”. Após o crescimento bacteriano de *Porphyromonas gingivalis* ou *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em placas de cultura, o laser de Er:YAG com pulsação simples foi aplicado nas placas de cultura com densidade de energia de 0,04 – 2,6 J/cm². O crescimento das colônias bacterianas nas placas onde foi aplicado o laser foi analisado depois da cultura anaeróbica.

Colônias de *Porphyromonas gingivalis* foram então individualmente expostas ao laser com pulsação simples e com energia de 1,8 – 10,6 J/cm². As unidades formadoras de colônias irradiadas foram contadas. Áreas com inibição de crescimento foram encontradas nos sítios irradiados com uma energia de 0,3 J/cm² ou maiores. As taxas de sobrevivência das bactérias viáveis nas colônias de *Porphyromonas gingivalis* irradiadas com o laser diminuíram significativamente com energia de 7,1 e 10,6 J/cm², quando comparados com o grupo controle. Esses achados sugerem que o laser de Er:YAG tem um alto potencial bactericida com um baixo nível de energia.

No mesmo ano, RADVAR et al.⁸³ estudaram protocolos que poderiam ser empregados clinicamente em dentes afetados pela doença periodontal através do laser de Nd:YAG com energias de 50 e 80 mJ e 10 pulsos por segundo. Essas energias usadas foram encontradas em trabalhos prévios que indicaram que quanto maiores os valores, maiores poderiam ser os danos na superfície radicular, e que 80 mJ teria um efeito bactericida “in vitro”. Oitenta sítios afetados periodontalmente, em dentes selecionados para extração de 11 pacientes com periodontite do adulto, foram aleatoriamente escolhidos e colocados em um dos quatro seguintes grupos: 1) Tratamento com laser com 50 mJ, 10 pps por 3 minutos; 2) Tratamento com laser com 80 mJ, 10 pps por 3 minutos; 3) Raspagem com curetas manuais; e 4) Sem tratamento (controle). A profundidade de sondagem, sangramento a sondagem, índice de placa, índice gengival e o volume de fluido foram mensurados padronizadamente por seis semanas. Amostras

microbiológicas subgengivais foram coletadas e repetidas imediatamente após o tratamento e após seis semanas. Somente o grupo da raspagem com curetas mostrou redução significativa na profundidade de bolsa e sangramento à sondagem ($p < 0,001$). As amostras microbiológicas foram colhidas imediatamente após o tratamento com o laser a 80 mJ e 10 pps, mostrando uma redução significativa no número de colônias bacterianas comparado ao padrão inicial ($p < 0,001$). A microscopia eletrônica não revelou nenhum dano térmico nas superfícies radiculares. Este estudo demonstrou que a aplicação do Laser de Nd:YAG pulsado com 50 mJ e 80 mJ favoreceu a redução do número de colônias bacterianas, porém os resultados clínicos encontrados não demonstraram vantagens ao tratamento mecânico radicular convencional.

Em 1997, HAFFNER et al.³⁵ avaliaram a efetividade do laser de Er:YAG, com foco de 600 μ m, para remover cálculo subgengival e cimento contaminado. A luz laser foi projetada com um ângulo de 30° sobre a superfície do espécime. Utilizou-se 80 dentes extraídos, divididos em 2 grupos: 40 dentes com cálculo e 40 sem cálculo. Os espécimes foram irradiados com energias de 60, 100, 200 e 500 mJ/pulso, frequências de 4 e 10Hz ($n = 5$ por parâmetro) e irrigação. A área irradiada (2mm x 2mm) estava fixa num dispositivo que se movia linear e continuamente controlado por um programa de computador. A ablação do tecido foi medida tridimensionalmente com um dispositivo de varredura à laser com precisão de 5 μ m e analisada com um "software" desenvolvido especialmente para

imagem onde observou-se o volume total, média, mediana e desvio padrão. As superfícies irradiadas também foram processadas para análise em microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que a média de ablação nos dentes sem cálculo variou de $35\mu\text{m} \pm 13,5\mu\text{m}$ (60 mJ/4Hz) a $380\mu\text{m} \pm 45,8\mu\text{m}$ (200 mJ/10Hz). Quando havia cálculo, ocorreu maior remoção de substância dentária, cuja média variou de $42\mu\text{m} \pm 9\mu\text{m}$ a $540\mu\text{m} \pm 80,4\mu\text{m}$. As superfícies tratadas apresentaram uma estrutura rugosa. Os autores concluíram que o laser de Er:YAG poderia ser uma possibilidade terapêutica mas a irregularidade da superfície deveria ser discutida e analisada clinicamente.

Também em 1997, ISRAEL et al.⁴⁷ compararam as alterações morfológicas das superfícies radiculares, tratadas “in vitro” pela irradiação com laser de Er: YAG, usando água para o resfriamento da superfície e os lasers de CO₂ e Nd:YAG, ambos com e sem o resfriamento de superfície. O experimento constituiu de 42 dentes recém extraídos que foram divididos igualmente e aleatoriamente em sete grupos de tratamento: raspagem e alisamento radicular com curetas manuais; laser de CO₂ com e sem superfície resfriada com ar/água; Nd:YAG laser com e sem superfície resfriada com ar/água e laser de Er: YAG com e sem resfriamento por ar/água. Os espécimes tratados com laser de CO₂ foram submetidos a densidades de energia de 100 a 400 J/cm² e o Er: YAG foi usado entre 20 e 120 J/cm². O grau de alteração morfológica das superfícies radiculares após a irradiação com CO₂ e Nd:YAG apresentaram relação direta com a

densidade de energia, mas não mostraram relação com o uso de resfriamento da superfície. Estes lasers induziram alterações superficiais incluindo cavitação, áreas de fusão e ressolidificação mineral e produção de carbonização superficial. Em contraste, o laser de Er:YAG produziu alterações na superfície radicular que podem ser esperadas do condicionamento ácido, como a remoção de *smear layer* e exposição de matriz colágena. Em adição, notou-se microfraturas definidas com estrutura mineralizada, porém não existiu evidência de fusão ou carbonização. Dados os parâmetros desse estudo, os autores concluíram que os lasers CO₂ e Nd:YAG alteram a superfície radicular de maneira indesejável. Entretanto, o laser Er:YAG quando usado em baixas densidades de energia, mostrou potencial suficiente para modificação da superfície radicular justificando-se novas investigações.

RECHMANN et al.⁸⁴ (1997), compararam o efeito dos lasers de Er:YAG (com parâmetros de 60 mJ/pulso, frequência de 6Hz, densidade de energia de 18 J/cm² e distância focal de 13mm) com o laser de Alexandrita e comprimento de onda de 377nm, na remoção de cálculo supra e subgingival de dentes extraídos. A irradiação foi perpendicular ao dente, com irrigação, em faixas que se estenderam pelo esmalte, JEC e superfície radicular. O aspecto da superfície foi analisado pela microscopia de luz e eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que o laser de Alexandrita produziu uma ablação rápida e seletiva do cálculo, sem efeitos adversos aos tecidos vizinhos (esmalte e /ou cimento). Os autores concluíram ainda que

há necessidade de peças de mão específicas para permitir sua utilização em bolsas periodontais e que a aplicação do laser de Er:YAG provocou a remoção do cálculo sem o controle da ablação dos tecidos subjacentes resultando numa superfície rugosa.

YAMAGUSHI et al.¹¹⁴, também em 1997, avaliaram os efeitos da irradiação do laser de Er:YAG nas superfícies radiculares, usando a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e avaliaram a capacidade de remoção dos lipopolissacarídeos (LPS). Um espectrofotômetro foi utilizado para investigar os efeitos do laser nos LPS aplicados na dentina radicular. Pré-molares extraídos por razões ortodônticas foram preparados para este estudo. As coroas foram cortadas abaixo da junção cimento-esmalte, longitudinalmente seccionadas, e o conteúdo da câmara pulpar foi removido. Em seguida, 15 amostras radiculares (5x5x1mm) foram classificadas em 3 grupos de 5: grupo 1, amostra sem nenhum tratamento; grupo 2, raspagem e alisamento radicular com manutenção do cimento; e o grupo 3 raspagem e alisamento radicular até que a superfície dentinária fosse descoberta. O centro de cada espécime foi usado como área experimental irradiada e a área periférica serviu como controle. Todos os grupos foram irradiados com energia de 100 mJ/pulso, frequência de 15 Hz e densidade de energia de 0,3 J/cm². O laser de Er:YAG removeu 83,1% do LPS. Quanto às alterações morfológicas verificou-se que no grupo 1 houve presença de pequenas crateras com paredes irregulares. No grupo 2, a superfície do cimento apresentou-se amorfa e irregular e no grupo 3 observou-se a exposição de

túbulos dentinários que apresentaram-se abertos e sem *smear layer*. Este estudo sugere que o laser de Er:YAG pode ser útil para o condicionamento radicular, na terapia periodontal. Entretanto, os autores destacam que testes clínicos são necessários para estabelecer os parâmetros do laser para o tratamento periodontal.

Um estudo em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizado por FUJII et al.³², em 1998, visando avaliar os efeitos da irradiação do laser de Er:YAG no cemento radicular. Os espécimes foram obtidos de dentes humanos extraídos comprometidos periodontalmente. O laser de Er:YAG foi então aplicado em diferentes níveis de energia de 25 à 100 mJ/pulso/seg. A irradiação de laser foi executada sob irrigação com água, com a extremidade perpendicular e em contato com a superfície radicular. Observações da superfície radicular mostraram uma superfície relativamente lisa nos espécimes controle. Nos espécimes expostos ao laser de Er:YAG, houve formação de um defeito circular na raiz. Subseqüentemente, os espécimes foram seccionados com uma lâmina perpendicularmente à superfície. Observações ao MEV desses espécimes mostraram uma camada de dano tecidual de 15 µm no cemento irradiado com o laser de Er:YAG. O tecido apresentou-se com uma aparência amorfa e os feixes de fibras da matriz cementária e de fibras de Sharpey não foram claramente distinguíveis. Estas observações indicaram, segundo os autores, que o cemento pode ser lesado pela irradiação com o laser de Er:YAG. Eles concluíram ainda que é preciso mais investigações sobre os efeitos

biológicos do laser de Er:YAG, antes da introdução dessa tecnologia na terapia periodontal.

Em 1999, MISRA et al.⁶³ tiveram como objetivos, em um estudo “in vitro”, avaliar o efeito do laser de dióxido de carbono nas superfícies radiculares comprometidas periodontalmente e comparar a eficiência do ácido cítrico, EDTA e peróxido de hidrogênio na remoção da *smear layer* da superfície radicular depois do alisamento radicular. O estudo foi conduzido em 50 dentes humanos unirradulares com prognóstico ruim. Imediatamente após a extração, os dentes foram raspados e alisados com curetas de Gracey. Cinquenta espécimes foram obtidos da face proximal da cada dente que foram divididos aleatoriamente em 4 grupos. No grupo A, 35 espécimes foram divididos em 7 subgrupos com 5 espécimes cada e irradiados com o laser de dióxido de carbono, usando o modo desfocado com 3 watt de potência por 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 ou 1.4 segundos, respectivamente. Os grupos B, C e D com 5 espécimes cada foram tratados com peróxido de hidrogênio à 6%, solução de EDTA (pH = 7,4) ou solução saturada de ácido cítrico (pH= 1,0), respectivamente por 3 minutos. Os espécimes foram analisados ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os autores concluíram que a *smear layer* estava presente nas superfícies dos dentes que foram raspados. A irradiação do laser de dióxido de carbono por 1.0 segundo e 3 watt removeu completamente a *smear layer* com mínimas alterações no diâmetro dos túbulos dentinários. Entretanto, o tempo de irradiação de 1.2 e 1.4 segundos produziram uma superfície

carbonizada, sendo totalmente inviável na exposição dos túbulos dentinários. O EDTA e o ácido cítrico foram efetivos na remoção da *smear layer*, mas os túbulos dentinários expostos mostraram-se afunilados.

FOLWACZNY et al.²⁹, em 2000, avaliaram em um estudo “in vitro” a utilização da radiação do Er:YAG em combinação com um novo sistema desenvolvido para a remoção de cálculos das superfícies radiculares. Utilizou-se 50 dentes que foram divididos em 2 grupos de 25 sendo o grupo A com cálculos e o grupo B sem cálculos. O laser de Er:YAG com comprimento de onda de 2,94 μm , com um pulso de duração de 250ns, e um pulso de repetição de 15pps. Em cada grupo, 6 dentes foram irradiados com 300 pulsos de 60 mJ, 80 mJ, 100 mJ, ou 150 mJ. As amostras foram movidas continuamente e linearmente usando um dispositivo controlado por um computador. A avaliação volumétrica da substância radicular removida foi analisada com um sistema de *scanner* a laser tri-dimensional (100.000 pontos da superfície por amostra, precisão: 5 μm) e a imagem foi avaliada num *software*. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para detectar as mudanças ultraestruturais na superfície radicular. A medida linear da substância removida nas amostras com cálculos (grupo A) revelou média de profundidade entre 174.38 (± 16.13) μm e 501.85 (± 111.01) μm . A profundidade dos defeitos nos dentes sem cálculos (grupo B) alcançou de 37.78 (± 14.03) μm até 484.44 (± 80.63) μm . A observação em MEV das superfícies radiculares tratadas com laser não revelaram sinais de danos térmicos, fusão ou fratura. Os resultados deste estudo mostraram que

a remoção de substância com radiação de laser de Er:YAG com baixa densidade de energia é comparável, em efeito, a superfície radicular depois da instrumentação convencional com curetas. Esses resultados parecem indicar que a remoção de cálculos pode ser seletivamente feita usando baixas energias de radiação. Considerando os resultados favoráveis na investigação pela MEV, o uso do laser de Er:YAG na terapia periodontal pode ser possível no futuro.

Também em 2000, AOKI et al.⁹ avaliaram a efetividade da raspagem para remoção de cálculos subgengivais com o laser de Er:YAG e as alterações morfológicas e histológicas da superfície radicular raspada, em comparação à efetividade e alterações produzidas na superfície radicular pela raspagem convencional com o ultrassom. Foram utilizados 53 dentes humanos extraídos por razões periodontais, com uma banda de cálculo subgengival. Os dentes foram divididos em dois grupos para raspagem com laser e com ultrassom. A irradiação com o laser de Er:YAG foi realizada com energia de 40 mJ/ pulso e 10 pps, com *spray* de água e com a ponta da sonda contactada obliquamente à superfície radicular. A raspagem com ultrassom teve sua potência padronizada. O tempo requerido para raspagem, a área raspada e as alterações térmicas foram determinadas para ambos tratamentos. As principais áreas das superfícies raspadas foram examinadas histologicamente e por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O laser de Er:YAG promoveu a remoção dos cálculos subgengivais num nível equivalente ao promovido pela raspagem com ultrassom, sem

elevação térmica. Macroscopicamente, a superfície radicular tratada com o laser estava um tanto irregular ou similar à raspagem radicular realizada com ultrassom. Entretanto, a eficiência da raspagem com o laser foi menor do que a raspagem com ultrassom. A análise histológica revelou áreas manchadas e com uma leve depressão, e a análise pela microscopia eletrônica de varredura revelou microirregularidades características na superfície tratada com o laser. Os autores concluíram que a raspagem com o laser promoveu um nível de remoção de cálculos similar aquele promovido pela raspagem com ultrassom, entretanto, o laser de Er:YAG produziu microalterações superficiais e estruturais no cimento radicular.

MELLO ⁶⁰ (2000) avaliou a efetividade do laser de Er:YAG na raspagem e alisamento radicular em comparação ao método tradicional com curetas. Seis pré-molares inferiores recém extraídos devido à doença periodontal foram seccionados longitudinalmente, tendo assim, duas metades da raiz. Estas metades foram separadas em quatro grupos. No grupo 1 utilizou-se o dente sem tratamento (grupo controle negativo), no grupo 2 (grupo controle) realizou-se raspagem e alisamento radicular com curetas de gracey. No grupo 3 foi realizado o tratamento com laser de Er:YAG com uma ponta de contato em forma de cunha, utilizando-se em um ângulo de 20 a 30 graus em relação à raiz. No grupo 4, aplicou-se o laser de Er:YAG e foi complementado o alisamento com cureta de gracey. Nos grupos tratados com laser, a energia utilizada foi de 60 a 300 mJ (in put) e a frequência de 10 Hz realizado com irrigação. Observou-se que nos grupos 2

e 3 foi obtido resultado semelhante em comparação a imagem observada da *smear layer*, já no grupo 4 obteve-se melhor resultado, pois a imagem em MEV foi mais regular. A conclusão do trabalho foi que com a associação das técnicas Er:YAG laser associado ao uso das curetas de gracey é superior frente ao tratamento convencional.

Em 2001, FOLWACZNY et al.³⁰, avaliaram “in vitro” o efeito da angulação da ponta de quartzo do laser de Er:YAG em relação a superfície radicular e a quantidade de cimento e/ou dentina removida. Foram utilizados 150 dentes extraídos. O laser utilizado foi o de Er:YAG com emissão pulsada e comprimento de onda de 2,94 μm e frequência de 10 Hz. Os dentes foram divididos em 3 grupos irradiados com 38 pulsos com energias de 60 mJ (grupo A) 100 mJ (grupo B) e 180 mJ (grupo C). Em cada grupo 10 amostras foram tratadas com angulações de trabalho de 15°, 30°, 45°, 60° e 90°. A quantidade de tecido removida foi determinada por um sistema de varredura de superfície com leitura a laser tri-dimensional. Uma imagem espacial foi analisada em um software (Mtch 3D). Os autores constataram uma forte relação entre a quantidade de substância removida e a angulação da ponta de trabalho. Usando-se 60 mJ, a profundidade do defeito foi de 41,39 ($\pm 32,55$) μm com uma angulação de 15° e a 90° foi de 181,39 ($\pm 74,42$) μm . Quando utilizada energia de 100 mJ, a profundidade do defeito estendeu-se de 51,96 ($\pm 26,86$) μm à 15° e a 90° foi de 639,89 μm em média. Estes resultados forneceram evidências claras de que, além

dos parâmetros físicos da radiação, também os parâmetros de manejo clínico, em particular a angulação da ponta de trabalho, tiveram forte influência na quantidade de substância radicular removida com o laser de Er:YAG.

Ainda em 2001, SCHWARZ et al.⁹⁶ realizaram um estudo clínico controlado, cujo objetivo foi comparar a efetividade do laser de Er:YAG com o procedimento convencional de raspagem e alisamento radicular, no tratamento mecânico radicular. Vinte pacientes com destruição periodontal moderada e avançada foram tratados com o laser de Er:YAG usando um nível de energia de 160 mJ/pulso com frequência de 10 Hz e raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais. Estes tratamentos foram empregados em diferentes quadrantes escolhidos aleatoriamente. Avaliações clínicas do índice de placa (IP), índice gengival (IG), sangramento à sondagem (SS), profundidade de sondagem (PS), recessão gengival (RG) e nível de inserção clínica (NIC) foram realizados previamente e após 3 e 6 meses do tratamento. Amostras de placa subgengival foram colhidas de cada marcação e analisadas quanto a presença de cocos (*motile rods* e *non-motile rods*) e espiroquetas. Diferenças nos parâmetros clínicos e a prevalência de espécies bacterianas foram analisadas usando o teste “t” pareado. Os autores observaram que o índice de placa remanescente quase não se modificou, enquanto uma redução significativa ocorreu no índice gengival em ambos os grupos após 6 meses ($P = 0,001$, $P = 0,001$ respectivamente). O valor médio do sangramento à sondagem diminuiu no

grupo tratado com laser de 56% para 13% após 6 meses ($P = 0,001$) e o grupo tratado com raspagem e alisamento radicular diminuiu de 52% para 23% após 6 meses ($P = 0,001$). O valor médio da profundidade de sondagem no grupo tratado com laser diminuiu de $4,9 \pm 0,7$ mm para $2,9 \pm 0,6$ mm depois de 6 meses ($P = 0,001$). No grupo tratado com raspagem e alisamento radicular houve diminuição de $5,0 \pm 0,6$ mm para $3,4 \pm 0,7$ mm depois de 6 meses ($P = 0,001$). O nível de inserção clínica em média diminuiu após 6 meses no grupo tratado com laser de $6,3 \pm 1,1$ mm para $4,4 \pm 1,0$ mm. No grupo da raspagem ocorreu diminuição de $6,5 \pm 1,0$ mm para $5,5 \pm 1,0$ mm ($P = 0,001$). A redução do índice de sangramento à sondagem e melhora do nível de inserção clínica foi significativamente maior no grupo tratado com laser em relação ao grupo tratado com raspagem ($P = 0,05$ e $P = 0,001$, respectivamente). Ambos os grupos mostraram uma diminuição significativa na quantidade de cocos e espiroquetas. Os autores concluíram que o laser pode representar uma alternativa conveniente no tratamento periodontal não-cirúrgico.

TANNOUS¹⁰⁶, em 2001, avaliou morfologicamente, pela microscopia eletrônica de varredura, as diferenças de interação laser-tecido em função das variações nos ângulos de aplicação do feixe laser. Catorze terceiros molares recém extraídos e mantidos hidratados em solução fisiológica de Cloreto de Sódio 0,9% foram divididos em 7 grupos, recebendo, respectivamente, aplicações com 100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 mJ por pulso. Cada espécime dos vários grupos recebeu três aplicações em

esmalte e três em cimento, pontuais e em contato, lado a lado, com ângulo de incidência do feixe em relação à superfície dental de 30, 45 e 90 graus respectivamente. Em cada aplicação foram dados 4 pulsos de Er:YAG (2,94mm;10-20 Hz, 200-500ms; 0,1-1J energia/pulso - Opus 20 - Opus Dent) com sistema de refrigeração à água (0,4 ml/seg). Após as aplicações foi feita a análise das amostras por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que, morfológicamente, existe grande variação nas características da interação laser-tecido em função do ângulo de aplicação do feixe laser. De acordo com as observações realizadas neste estudo, pôde-se concluir que, dentro dos parâmetros utilizados, o fator de variação do ângulo de aplicação mostrou-se de grande importância na obtenção do efeito morfológico desejado, constituindo um detalhe extremamente relevante na descrição técnica de protocolos de aplicação do laser de Er:YAG em tecidos dentais.

THEODORO¹⁰⁹, também em 2001, realizou um estudo comparativo pela microscopia eletrônica de varredura, sobre a efetividade da ação do ácido cítrico, EDTA, ácido cítrico associado ao cloridrato de tetraciclina e laser de Er:YAG na remoção de *smear layer*, de superfícies radiculares após o tratamento de raspagem e alisamento radicular. Trinta espécimes de superfícies radiculares submetidas à raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais foram divididos em 6 grupos: grupo controle (G1) não recebeu nenhum tratamento; grupo 2 (G2) recebeu aplicação de ácido cítrico 24%, pH 1, na forma de gel, durante 2 minutos; grupo 3 (G3) recebeu

aplicação de EDTA 24%, pH 7, na forma de gel durante 2 minutos; grupo 4 (G4) recebeu aplicação de ácido cítrico associado a cloridrato de tetraciclina 50%, pH 1, na forma de gel, durante 2 minutos; grupo 5 (G5) recebeu aplicação do laser de Er:YAG (2,94mm), 47 mJ, 10 Hz, focado, tempo de exposição de 15s e fluência de 0,58 J/cm²; grupo 6 (G6) recebeu aplicação de laser de Er:YAG (2,94mm), 83 mJ, 10 Hz, focado, tempo de exposição de 15s e fluência de 1,03 J/cm². Os resultados analisados através do teste de Kruskal Wallis com 5% de significância originaram o valor H=20,31 (p<0,01) onde o G1 (28,0) foi estatisticamente diferente de todos os grupos tratados; os grupos G2 (13,4), G3 (11,7) e G4 (13,6) não se diferiram significativamente dos grupos G5 (20,3) e G6 (6,0) e que o G6 foi estatisticamente diferente do G5. Diante destes resultados concluiu-se que: 1) o procedimento de raspagem e alisamento radicular com curetas manuais promoveu formação de intensa camada de *smear layer*, 2) todos os diferentes tratamentos propostos, mostraram-se efetivos na remoção de *smear layer*, demonstrando diferença estatisticamente significativa do G1.

Em 2002, FRENTZEN, BRAUN e ANIOL³¹ avaliaram os efeitos da instrumentação com laser de Er:YAG em superfícies radiculares comprometidas por doença periodontal comparado com a remoção mecânica de placa e cálculo com ultrassom e curetas manuais. Áreas de cálculos foram identificadas em 40 dentes humanos recém extraídos. Cada uma dessas áreas foram aleatoriamente divididas em duas partes iguais. O local controle foi tratado com raspagem e alisamento radicular ou com

ultrassom. O local teste foi tratado com laser de Er:YAG de acordo com as instruções do fabricante (parâmetros de 100mJ/pulso, 10Hz , num ângulo de 20 graus com a superfície radicular). O tempo de irradiação seguiu parâmetros visuais, até que não mais se detectasse a presença de cálculos. As amostras foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura e em microscópio de luz. Os autores observaram que a raspagem com instrumentos manuais resultou no debridamento completo dos cálculos e maior lisura superficial quando comparado as superfícies tratadas com laser de Er:YAG, cujas superfícies apresentaram maior rugosidade. Os autores ressaltam que as alterações provocadas no cimento e na dentina podem influenciar algumas situações clínicas e sugerem que os parâmetros de energia devem ser considerados.

FEIST ²⁷, em 2002, verificou em um estudo in vitro, a adesão e a proliferação de fibroblastos de gengiva humana sobre superfícies radiculares tratadas com laser de Er:YAG (Kavo Key II) e instrumento manual. Utilizou-se 27 dentes unirradiculares recém-extraídos com doença periodontal. O cálculo visível foi removido de todas as faces experimentais e a amostra foi dividida em três grupos: A) superfícies radiculares aplainadas com cureta Gracey nº. 3/4; B) superfícies radiculares irradiadas com a fibra óptica periodontal, energia de 35 mJ/pulso, frequência de 10 Hz, irrigação contínua e duas aplicações de 10 segundos cada, com intervalo de 10 segundos; C) superfícies radiculares irradiadas da mesma forma que no grupo anterior, com energia de 59 mJ/pulso. Os fragmentos de 5mm x 6mm obtidos foram autoclavados, plaqueados com 1×10^3 células e acompanhados por 1, 2 e 3

dias. Os espécimes foram processados para microscopia eletrônica de varredura e a contagem das células foi feita sobre as eletromicrografias com o auxílio de uma grade quadriculada. Os fibroblastos de gengiva humana aderiram e proliferaram sobre todas as superfícies tratadas. Nos dias 1 e 2, a mediana do número de células sobre os fragmentos do grupo B foi significativamente maior do que sobre os fragmentos dos outros dois grupos. Três dias após o plaqueamento, as células dos grupos A e B apresentaram total confluência. A mediana do número de células sobre os fragmentos do grupo B foi significativamente maior do que sobre os fragmentos do grupo C. Baseados nestes resultados, concluiu-se que as superfícies tratadas com laser de Er:YAG (35 mJ/pulso) favorecem a adesão e a proliferação de fibroblastos sendo o número de células e a velocidade da proliferação maiores do que em superfícies tratadas com alisamento radicular ou laser de Er:YAG (59 mJ/pulso).

2.2 Tratamentos Radiculares Convencionais

Nesta parte serão apresentados os trabalhos de maior relevância encontrados na literatura a respeito dos tratamentos convencionais utilizados na terapia periodontal como a raspagem e o alisamento radicular e o condicionamento com substâncias desmineralizantes.

BASS ¹⁶ em 1951, interessado em estudar as alterações cementárias descreveu pela primeira vez. a presença de grânulos no cimento e dentina subjacente, expostos à bolsa periodontal, aos quais chamou de "grânulos

patológicos". Admitiu que tais grânulos são completamente removidos por álcool.

HATFIELD; BAUMHAMMERS ⁴⁰ (1971) estudaram o efeito citotóxico de raízes de dentes comprometidos pela doença periodontal em culturas de células epiteliais, comparando-o ao de raízes de dentes retidos, que não haviam tido contato com o meio bucal. Os resultados mostraram que, enquanto as raízes contaminadas provocavam danos celulares irreparáveis nas culturas, no controle as células apresentavam mitoses e características de normalidades. Os autores levantaram a hipótese de que o fator tóxico tem origem no conteúdo da bolsa periodontal e dificultaria a reinserção dos tecidos periodontais aos dentes.

ARMITAGE; CHRISTIE ^{11,12} (1973) relataram a presença de "grânulos patológicos" no cimento exposto ao meio bucal pela doença periodontal. Os autores sugeriram que novas pesquisas deveriam ser realizadas para constatar a interferência da raiz exposta no processo de nova inserção conjuntiva. No mesmo ano, ao microscópio eletrônico esses autores mostraram a presença de vacúolos no cimento exposto pela doença periodontal, onde as fibras conjuntivas do cimento não sofreram completa mineralização, ficando sujeitas mais facilmente à degradação.

Em 1973, REGISTER ⁸⁶ utilizou o tratamento com ácido hidroclorídrico na dentina, por 15 minutos. O ácido foi lavado com solução

salina estéril. O aparelho de inserção foi completamente removido em áreas limitadas de 21 dentes de dois macacos, dois cães e um gato, e um corte expôs a superfície da dentina coberta por um retalho de espessura parcial. Essa dentina desmineralizada pelo contato com o ácido demonstrou reinserção nas áreas desmineralizadas quando comparada com os espécimes controle. Além disso, nos macacos e gato, a dentina tratada com ácido induziu a formação de grandes quantidades de novo cemento e osso. As amostras controles não mostraram reinserção do tecido conjuntivo, havendo pouca ou nenhuma formação de cemento e osso.

ALEO et al.⁴ (1974) encontraram uma substância, extraída do cemento de dentes com doença periodontal, tóxica para fibroblastos do rato e que foi identificada como tendo propriedade de endotoxinas. No ano seguinte, ALEO et al.⁵ estudaram “in vitro” a união de fibroblastos de gengiva humana à superfície radicular exposta pela doença periodontal. Nessas condições, a raiz apresentou-se sem ou com poucas células a ela unidas, sendo que as células uniram-se normalmente à parte remanescente da raiz, não envolvida pela doença periodontal; raízes que receberam tratamento com fenol e água ou remoção mecânica do cemento da mesma maneira permitiram a união das células. Por esta razão, ao extrapolar os dados para situações “in vivo”, consideraram que o sucesso do tratamento depende da remoção completa do material tóxico do cemento doente ou da remoção do próprio cemento.

Em outro estudo, REGISTER; BURDICK ⁸⁷ (1975) usando vários agentes desmineralizantes (ácido hidrocloreídrico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido tricloroacético e ácido fórmico) confirmaram a reinserção acelerada com cementogênese sobre a dentina radicular, cirurgicamente exposta e desmineralizada. Nos espécimes foi identificada uma área com ótima desmineralização relacionada ao tipo de agente, pH e tempo de aplicação. Esta área induziu consistentemente a reinserção do retalho com cementogênese, enquanto a desmineralização acima e abaixo desta área aumentou a reinserção relativa ao controle não desmineralizado, mas não induziram consistentemente novo cimento. A utilização do ácido cítrico, com pH=1,0, por 2 a 3 minutos, demonstrou melhores resultados, com reinserção do retalho e formação de novo cimento.

Em 1977, STAHL ¹⁰² relatou a possibilidade de tratamento de dentes periodontalmente comprometidos através da associação da terapia mecânica com o tratamento químico radicular. As principais vantagens descritas foram a capacidade de remoção das endotoxinas bacterianas aderidas à superfície radicular, com agentes como o fenol e o ácido clorídrico. Através de avaliações histológicas de espécimes animais e humanos, observou-se a ocorrência de reparo tecidual pela formação de epitélio juncional longo e formação de fibras colágenas, com orientação paralela em relação à superfície dentária, sem reformação de cimento acelular e reinserção de fibras. Esse padrão de reparo foi denominado de adesão conjuntiva.

RUBEN ⁹² (1978) enfatizou a importância da preparação das raízes alteradas pela doença periodontal, salientando que as mesmas devem ser raspadas, removendo-se as irregularidades que favorecem o acúmulo de placa, cálculo e exsudato inflamatório. Como esses produtos podem ser citotóxicos, o autor relatou que a raiz bem raspada, de forma que sua face seja mineralizada e fique microirregular, parece ter aposição mais favorável e mais firme de cementóide e cimento. Isto seria importante porque a reinserção demanda a formação de novo cimento sobre o cimento e/ou dentina, dentro do qual se inserem novas fibras conjuntivas. Nesse contexto, considerou que a aplicação de ácidos inorgânicos ou orgânicos, tais como HCl 0,6N, ácido cítrico ou fosfórico podem aumentar a cementogênese e inclusive a união ao dente.

GARRETT et al.³³, também em 1978, estudaram “in vitro” o efeito da aplicação do ácido cítrico pH 1 por 3 minutos em raízes afetadas periodontalmente. Observaram em microscopia eletrônica que o procedimento não teve efeito sobre raízes que previamente não haviam recebido raspagem e alisamento. Contudo, nas raízes em que se observou este cuidado, o ácido cítrico produziu uma superfície com exposição das fibras colágenas e freqüentes depressões. Os autores sugeriram, então, que o sucesso relativo da aplicação do ácido no processo de reinserção periodontal poderia estar relacionado ao fato de que as fibras colágenas do cimento, expostas pelo ataque ácido, serviriam como elo de união com as

fibras do retalho. Este fato foi considerado importante para evitar o desenvolvimento de um epitélio juncional longo.

CATON; ZANDER²¹ (1979), mostraram em macacos, que a natureza da inserção entre dente e tecido gengival após o alisamento radicular combinado com curetagem do tecido mole a cada três semanas, resultou na formação de um epitélio juncional longo, concluindo que a resistência aumentada dos tecidos gengivais, comumente observada após os procedimentos empregados no estudo, é mais um resultado da formação de um epitélio juncional longo e fibras não inseridas na raiz, do que o estabelecimento de nova inserção de tecido conjuntivo.

BOYKO; BRUNETTE; MELCHER¹⁹, em 1980, relataram em um trabalho no qual removeram as coroas e o ligamento periodontal de molares extraídos de suínos. Os dentes foram desmineralizados com ácido cítrico por 3 minutos, ácido hidrocloreídrico e ácido dietil-aminotetra-acético, também por 3 minutos. Posteriormente, as raízes foram colocadas em meio de cultura de fibroblastos, sendo que ocorreu um número maior de células aderidas as raízes desmineralizadas do que as não desmineralizadas.

RIRIE et al.⁸⁸, em 1980, compararam o processo de cicatrização em cães, 7 a 42 dias após uma incisão cirúrgica ao longo da interface dentogengival, alisamento radicular e reposicionamento do retalho com e sem o condicionamento dos dentes expostos com ácido cítrico. Observaram

que a cicatrização após o condicionamento com ácido cítrico pareceu consideravelmente mais avançada entre 14 e 42 dias, com relação à maturação do tecido conjuntivo e restabelecimento da inserção periodontal. Houve melhora no padrão de cicatrização do tecido conjuntivo assim como rapidez e restabelecimento da inserção do tecido conjuntivo através de extensa integração de fibrilas colágenas novas e velhas na interface dente-gengiva. Houve ainda recalcificação da dentina afetada pelo ácido e deposição de novo cimento.

LOPEZ et al.⁵⁶ (1980) avaliaram o potencial inflamatório do cimento periodontalmente comprometido, implantando 70 fragmentos radiculares autógenos na mucosa bucal de 56 humanos. Seus resultados histológicos demonstraram que o cimento obtido de raízes raspadas não autoclavadas produziu uma inflamação mais severa do que o cimento doente autoclavado, o que indica que o cimento contaminado contém outros agentes ou substâncias inflamatórias termolábeis, além das endotoxinas. A inflamação encontrada nas biópsias dos implantes de cimento removido de raízes cuidadosamente raspadas, persistiu da oitava à trigésima-primeira semana, levando a crer que restou endotoxina suficiente no cimento para causar a inflamação e que a liberação para o tecido conjuntivo pode ter sido lenta, já que oito semanas parece ser tempo suficiente para que os mecanismos de defesa do organismo resolvam qualquer inflamação causada pela pequena quantidade de endotoxina contida nos implantes. Também encontraram relação direta entre grau de inflamação e quantidade

de cimento remanescente. Concluíram, a partir dessas observações que apenas a raspagem não é um método adequado para eliminar a endotoxina da superfície da raiz, ainda que todo o cimento seja removido com este procedimento. Extrapolando seus resultados para a situação clínica, afirmam que, para conseguir inserção de tecido mole à raiz, é essencial a remoção dos materiais tóxicos do cimento envolvido e que nos casos de doença periodontal avançada, parece ser necessária a remoção de todo o cimento envolvido.

COLE et al.²⁴ (1980) avaliaram a regeneração do tecido conjuntivo gengival de dentes periodontalmente comprometidos, em pacientes, nos quais, após o levantamento de um retalho muco-perióstico e a demarcação do nível apical do cálculo por um sulco feito nas raízes, estas foram totalmente raspadas e tratadas com uma solução saturada de ácido cítrico durante cinco minutos. Em quatro meses de controle pós-operatório, todos os cortes histológicos dos dentes e tecidos periodontais circundantes mostraram regeneração do tecido conjuntivo, caracterizada por deposição de novo cimento, com inserção de fibras conjuntivas, sendo que várias amostras apresentam o epitélio juncional terminando de 1,2 a 2,6mm coronalmente ao sulco produzido nas raízes.

PROYE; POLSON⁸² (1982) extraíram e reimplantaram dentes sem doença periodontal de quatro macacos-esquilo, que receberam desnudamento cirúrgico e alisamento radiculares. A análise histológica, três

dias após este procedimento, mostrou que ocorre migração do epitélio juncional o qual, aos sete dias, já se encontrava dentro do ligamento periodontal e aos 21 dias, no limite apical da instrumentação das raízes.

POLSON; PROYE ⁸⁰ (1982), como segunda parte do trabalho citado anteriormente, acrescentaram o condicionamento com ácido cítrico das superfícies radiculares e aos três dias, observou-se uma camada de fibrina interpondo-se entre o dente e o tecido periodontal, que impediu a migração apical do epitélio juncional e que aos sete dias, foi substituída por tecido de granulação, com fibras inserindo-se perpendicularmente à superfície radicular. Aos 21 dias nova inserção de tecido conjuntivo ocorreu e esta condição parece depender do estabelecimento precoce da ligação da fibrina ao dente.

Também em 1982, DALY ²⁶ avaliou "in vitro" o efeito antibacteriano do ácido cítrico pH 1 em superfícies de raízes com depósito de placa. O experimento consistiu da exodontia e lavagem dos dentes em solução salina 0,85% para remover o sangue, após o que os dentes do grupo experimental foram imersos no ácido por 3 minutos, depois lavados com solução salina e colocados em meios de culturas para bactérias aeróbicas e anaeróbicas. Os dentes do grupo controle foram colocados diretamente nos meios de culturas sem passar pelo ácido. Os resultados indicaram que o ácido cítrico teve a capacidade de reduzir, em todos os casos, o número de colônias bacterianas em crescimento, indicando uma atividade antibacteriana sobre

depósitos de placa presentes em dentes com doença periodontal. Relacionou-se este efeito ao pH baixo, considerando que a alta concentração de hidrogênio pode desnaturar os componentes próximos ou dentro dos microorganismos. Considerou ainda que em uma cirurgia periodontal onde o cimento permaneça contaminado após a raspagem, o ácido cítrico aplicado por 3 minutos pode exercer efeito antibacteriano direto.

NYMAN et al.⁶⁸ (1985), examinando o efeito do tratamento com ácido cítrico sobre a cicatrização periodontal, estabeleceram três grupos experimentais em macacos: 1) dentes extraídos sem doença periodontal foram reimplantados imediatamente em seus próprios alvéolos; 2) dentes extraídos sem doença periodontal foram raspados e reimplantados; e 3) dentes periodontalmente comprometidos foram raspados e transplantados para alvéolos de dentes saudáveis. Porém, antes do reimplante ou transplante, metade dos dentes do segundo e terceiro grupos foram tratados com ácido cítrico pH 1, por três minutos. Após seis meses de cicatrização, não foi observada inserção de tecido conjuntivo na maioria das raízes que foram destituídas de seu ligamento periodontal. O tipo de cicatrização mais freqüente foi reabsorção radicular e anquilose, tanto nas raízes em que o ligamento periodontal foi removido mecanicamente, como naqueles em que a doença periodontal destruiu o ligamento periodontal, com ou sem aplicação de ácido cítrico. Concluíram então que o resultado da cicatrização é determinado pelo tipo celular que repovoa a área adjacente à raiz.

HANES; POLSON; LADENHEIM ³⁸, em 1985, testaram as respostas do tecido epitelial para espécimes de dentina, obtidas a partir de raízes de dentes humanos, após a desmineralização superficial. Foram obtidos espécimes dentários retangulares e o lado da polpa foi marcado. Os espécimes foram implantados no dorso de ratos, com a ponta protruindo através da pele. Metade dos espécimes foi tratada com ácido cítrico pH 1,0 por 3 minutos, enquanto que os espécimes remanescentes serviram como controle não tratados. Os autores observaram que as superfícies desmineralizadas tiveram um grande número de células aderidas, ocorreu a inserção de fibras e a migração apical do epitélio foi inibida. A inserção de fibras nos espécimes experimentais diferiu morfológicamente da inserção de fibras nas superfícies radiculares normais.

POLSON; LADENHEIM; HANES ⁷⁹ (1986), implantaram no tecido subcutâneo de ratos, fragmentos de dentina radicular removidos de dentes comprometidos por doença periodontal, cuja superfície foi desmineralizada por ácido cítrico pH=1,0 por três minutos, de forma que parte do fragmento ficasse imerso no tecido conjuntivo e parte, exposto ao meio externo, protruindo da pele do animal. Após um, três, cinco e dez dias deste procedimento, foram removidas biópsias contendo os fragmentos e tecidos circundantes para análise histológica. Foi observado que, em comparação a fragmentos-controle não desmineralizados, as superfícies desmineralizadas apresentam maior número de células a elas inseridas, com inserção de fibras conjuntivas e inibição da migração de células epiteliais. Os autores

apresentam como possível explicação para esses eventos, o fato de que a instrumentação das superfícies radiculares para a remoção de cálculo e do cimento e o tratamento com ácido cítrico, removeram provavelmente, toda a endotoxina bacteriana dessas superfícies. Além disso, o tratamento com ácido cítrico resultaria na exposição da matriz colágena da dentina, que consiste principalmente de colágeno tipo 1, cujos produtos de degradação são quimiotáticos para PMN, macrófagos e fibroblastos. Isto explicaria a presença da inserção de fibras conjuntivas à dentina desmineralizada.

POLSON; HANES ⁷⁷, em 1989, realizaram trabalho em ratos a fim de testar as respostas dos tecidos conjuntivo e epitelial. Fragmentos dentários obtidos de dentes humanos afetados pela doença periodontal, foram implantadas transcutaneamente no dorso dos animais. O lado correspondente ao cimento foi tratado com ácido cítrico pH 1,0 por 3 minutos. De acordo com os autores, parece que o tratamento com ácido cítrico falhou em desmineralizar suficientemente o cimento afetado pela periodontite e expor a matriz colágena. A inserção de fibras não ocorreu no cimento, neste estudo.

HANES; POLSON ³⁶, em 1989, testaram as respostas dos tecidos conjuntivo e epitelial sobre o cimento de fragmentos dentários, obtidos de dentes humanos normais cobertos pelo ligamento periodontal, implantados transcutaneamente no dorso de ratos. Depois de 10 dias, tanto o grupo controle quanto o grupo experimental, mostraram um grande número de

células aderidas à superfície do cimento desmineralizado. Os autores concluíram que o tratamento com ácido cítrico pode desmineralizar a superfície do cimento de raízes normais e que a desmineralização superficial deste cimento facilitou a inserção de fibras e células na superfície do cimento.

Em 1989, RUBO⁹³ avaliou o desgaste produzido pela raspagem empregando cinco toques de um raspador ultra-sônico e 10 e 20 golpes de um raspador manual sobre superfícies radiculares de 10 dentes extraídos por razões periodontais. Outros 10 dentes indicados para extração por doença periodontal foram obtidos de um mesmo indivíduo, os quais, após a extração, receberam três tipos de tratamento no terço médio das áreas radiculares expostas à bolsa periodontal, que foram removidas sob a forma de fragmentos padronizados para implantação no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, onde permaneceram por 30 dias. A avaliação do desgaste sofrido pelos 10 primeiros dentes, ao microscópio óptico demonstrou que: 1) cinco toques do raspador ultra-sônico desgastaram $80 \pm 49,82\mu\text{m}$ de estrutura dental; 2) 10 golpes de cureta manual desgastaram $110,7 \pm 44,50\mu\text{m}$ de estrutura dental; e 3) 20 golpes de cureta manual desgastaram $139,5 \pm 87,28\mu\text{m}$, porém estas diferenças não foram estatisticamente significantes. A análise histológica 30 dias após a implantação dos fragmentos radiculares obtidos dos outros 10 dentes demonstrou que: 10 golpes de cureta manual produzem o mesmo efeito que nenhum tratamento sobre os parâmetros histológicos observados; a

raspagem ultra-sônica produziu níveis insatisfatórios de inflamação em comparação aos níveis encontrados no grupo controle; o grau de inflamação provocado pelos fragmentos raspados com 20 golpes de cureta manual foi semelhante ao provocado por fragmentos saudáveis. O alto desvio-padrão encontrado sugere que fatores como força aplicada ao instrumento, grau de afiação dos mesmos e dureza superficial dos fragmentos dentários podem ter influenciado nos resultados levando a crer que a quantidade de desgaste de estrutura dental não é controlável. Compreende-se a partir destes resultados que o tratamento radicular ainda é uma condição fundamental para o estabelecimento de uma reversão do processo inflamatório, Porém, o nível de instrumentação não deve se basear apenas na textura superficial da raiz, tampouco no número de golpes do instrumento, mas sim na resposta tecidual que o tratamento evoca.

HANES; O'BRIEN; GARNICK ³⁹, em 1991, avaliaram através de microscopia eletrônica de varredura a morfologia da dentina radicular após usar: 1) técnica de fratura exposta (controle); 2) instrumentação manual; 3) instrumentação manual e condicionamento com ácido cítrico em solução saturada, pH 1,0 durante 5 minutos; 4) instrumentação manual e condicionamento com tetraciclina HCl solução 0,5%, pH 3,2 durante 5 minutos. Um total de 10 incisivos bovinos foram usados, onde o cimento foi fraturado, removido e dividido em 4 partes, as quais foram tratadas da maneira descrita acima. Os autores observaram que a superfície da dentina que foi instrumentada resultou na formação de uma superfície com *smear*

layer. Não houve diferença entre os grupos com relação à percentagem da área superficial ocupada pelos orifícios dos túbulos dentinários. O diâmetro dos túbulos foi maior no grupo tratado com ácido cítrico do que aqueles do grupo controle. O tamanho e diâmetro dos túbulos não foram estatisticamente diferentes daqueles tratados com ácido cítrico ou grupo controle, enquanto que a tetraciclina desmineralizou a dentina peritubular em menor grau que o ácido cítrico, sendo portanto necessária uma concentração maior de tetraciclina para que esta possa remover a “*smear layer*” produzida pela instrumentação.

Em 1992, LABAHN et al.⁵³ avaliaram os efeitos do ácido cítrico e da tetraciclina em solução, sobre a superfície dentinária, quando aplicados passivamente ou na forma de brunimento. Utilizaram neste estudo blocos de dentina de terceiros molares impactados, que foram raspados e divididos aleatoriamente em dois grupos. Em um dos grupos os espécimes foram tratados com tetraciclina, enquanto em outro foi tratado com ácido cítrico, que foi aplicado com tempos de 30, 60, 120 ou 240 segundos. Os resultados analisados através de microscopia eletrônica de varredura, demonstraram que ambos os tratamentos foram capazes de remover a *smear layer*, o aumento do diâmetro dos canalículos dentinários foram maiores nos grupos do ácido cítrico onde a penetração foi significativamente maior; a técnica passiva ou ativa não pareceu ter maior impacto nas medidas da morfologia. Os autores concluíram que o ácido cítrico provoca maior alteração que a

tetraciclina na superfície radicular, e que o modo de aplicação não parece influenciar no efeito do tratamento.

CHAVES et al.²³, em 1993, analisaram pela microscopia eletrônica de varredura, a ação do ácido cítrico sobre dentes comprometidos periodontalmente. Cinqüenta dentes humanos unirradiculares foram selecionados e divididos em 5 grupos, sendo: grupo 1) 10 dentes sem comprometimento periodontal; grupo 2) 10 dentes comprometidos sem nenhum tratamento; grupo 3) 10 dentes comprometidos receberam apenas o condicionamento com ácido cítrico (pH=1); grupo 4) 10 dentes comprometidos receberam apenas raspagem e alisamento radicular; grupo 5) 10 dentes comprometidos receberam raspagem e alisamento radicular seguido do condicionamento com ácido cítrico (pH=1). O tempo de aplicação do ácido foi de 3 minutos. Após a instrumentação e condicionamentos, os dentes foram preparados para análise em microscopia eletrônica de varredura. Como resultados observou-se: grupo 1) superfície normal radicular com cemento recobrindo a dentina presente nos 10 dentes; grupo 2) massas densas de cálculo cobrindo várias áreas da superfície do cemento. Algumas bactérias podiam ser observadas ao redor e entre os espaços das massas de cálculo; grupo 3) cemento podia ser observado por toda a superfície, porém não uniforme; massas de cálculo estavam presentes; grupo 4) as superfícies apresentavam-se lisas planas e regulares, com a presença de estrias paralelas, provocadas pela raspagem. Em maiores magnificações, podia ser observado *smear layer* cobrindo os

túbulos dentinários onde havia dentina exposta; grupo 5) a superfície apresentava-se uniforme, plana e lisa em pequeno aumento. Em maior aumento observava-se a ausência da *smear layer*, com túbulos dentinários desobstruídos e as áreas intertubulares apresentavam desmineralização, com fibras colágenas expostas.

Também em 1993, LAFFERTY; GHER; GRAY ⁵⁴ avaliaram, em microscopia eletrônica de varredura, as características da superfície radicular de dentes comprometidos por problemas periodontais, após a raspagem com curetas e brocas, e condicionamento com ácido cítrico e tetraciclina HCl. Foram utilizados 30 dentes, extraídos de 22 pacientes, com as seguintes características: 1) nenhum procedimento periodontal havia sido realizado nos últimos 6 meses; 2) bolsas verticais proximais de 5mm ou mais; 3) sangramento à sondagem; 4) ausência de cáries proximais na área radicular; 5) pacientes acima de 30 anos. Os dentes extraídos foram armazenados em soro fisiológico até a preparação. Os dentes foram seccionados no sentido axial, vestibulo lingual, com discos de carborundum. As metades das raízes foram, então, vigorosamente raspadas com curetas e brocas até que obtivessem aspecto de vidro liso e foram condicionadas com ácido cítrico (pH=1) e tetraciclina HCl por 5 minutos. Após o condicionamento, as peças foram lavadas e preparadas para análise em microscopia eletrônica de varredura. Os autores observaram que tanto o ácido cítrico quanto a tetraciclina HCl foram efetivos na remoção da *smear*

layer e deixaram à mostra os túbulos dentinários e filamentos de colágeno nas superfícies intra e inter tubulares.

HIGASHI; OKAMOTO ⁴⁴ (1995) realizaram um estudo "in vitro", para analisar o efeito do ácido cítrico sobre a *smear layer*, após raspagem e alisamento radicular com curetas, seguida de irrigação com seringa e com ultrassom. Utilizaram 2 grupos controle: o grupo I sofreu raspagem e alisamento radicular e irrigação de solução salina com seringa e o grupo II foi tratado com raspagem e alisamento radicular e irrigação com ultrassom. As amostras dos grupos experimentais foram imersas em ácido cítrico na concentração de 25% (pH 1.62) durante 3 minutos. Um grupo experimental sofreu irrigação com solução salina através de seringa e o outro irrigação com ultrassom. Os resultados foram analisados através de microscopia eletrônica de varredura e demonstraram que no grupo do ácido cítrico com irrigação com seringa, alguns remanescentes de *smear layer* estavam presentes na maioria das amostras; quando associou-se o ácido cítrico com a irrigação com ultrassom houve 100% de remoção de *smear layer* da superfície radicular e exposição das fibras colágenas. Diante dos resultados, os autores concluíram que o condicionamento com ácido cítrico, seguido com irrigação com ultrassom é mais efetivo na remoção de *smear layer*.

HAWKINS; STERRET; RUSSEL ⁴¹, em 1997, estudaram se o meio de armazenamento de um dente, após sua extração, poderia afetar o efeito do condicionamento por ácido cítrico, com o passar do tempo, em pesquisas.

Ainda avaliaram se o modo como o ácido é aplicado sobre a superfície altera o resultado final. Para tal, 12 dentes humanos recém extraídos, foram selecionados e divididos em dois grupos: no grupo A, os dentes foram preparados logo após sua extração; no grupo B, os dentes foram armazenados por 6 semanas em soro fisiológico. Após este período, os dentes foram preparados da seguinte forma: a coroa e os terços médios e apicais das raízes foram seccionados e o fragmento remanescente foi novamente seccionado no sentido axial. No centro do remanescente foram delimitadas, com brocas esféricas, duas áreas com 2mm x 2mm. Em uma das áreas foi realizada uma curetagem vigorosa a fim de remover todo o cimento. Na outra área foi realizada uma curetagem leve, a fim de remover apenas os tecidos moles aderidos, preservando o cimento. Os grupos foram então subdivididos para a aplicação do ácido cítrico sendo que metade de cada grupo recebeu ácido cítrico a 30% por 5 minutos, gotejado sobre a superfície e a outra metade recebeu ácido cítrico nas mesmas concentrações e tempo, porém friccionando a solução com bolinhas de algodão. Para a avaliação dos resultados foi utilizada microscopia eletrônica de varredura, avaliando a quantidade de colágeno exposta, tanto na dentina quanto no cimento. Não foram encontradas diferenças significantes quanto ao armazenamento dos fragmentos em soro. Quanto à forma de aplicação, as superfícies que receberam o ácido por gotejamento demonstraram quantidades menores de colágeno exposto do que os que foram friccionados com algodão. Os autores concluíram que, em meios experimentais, não há

diferença entre usar um dente recém extraído ou um dente armazenado em solução salina, quando deste tipo de análise.

OLIVEIRA ⁷⁰, em 1998, avaliou o efeito do condicionamento radicular com o fator de crescimento PDGF-BB sobre o processo de reparo do tecido conjuntivo, comparando este procedimento aos tratamentos mecânico e químico da raiz. Trataram-se fragmentos de raízes afetadas pela periodontite de acordo com o grupo de estudo: raspagem e alisamento radicular (grupo 1); raspagem e alisamento radicular seguido de tratamento químico com ácido cítrico (grupo 2); e raspagem e alisamento radicular, tratamento com ácido cítrico, mais a aplicação de PDGF-BB, diluído em ácido acético, à concentração de 100 µg/ml (grupo 3). Implantaram-se os fragmentos no tecido subcutâneo da superfície dorsal de ratos. Ao final de 3, 7 e 15 dias, quatro amostras de cada grupo estavam disponíveis para o exame histológico e histomorfométrico dos tecidos moles que envolviam os fragmentos. Em três dias, as amostras do grupo 3 se destacaram por já apresentarem um tecido rico em células com características sugestivas de fibroblastos e macrófagos, além da deposição de fibras do tecido conjuntivo. Em sete dias, a análise histomorfométrica demonstrou uma concentração de células inflamatórias maior próximo aos fragmentos do grupo 1 e menor no tecido adjacente aos do grupo 3. Histologicamente, as amostras deste grupo aparentaram concentração de fibras maior que nos demais grupos. Em 15 dias já não foi possível diferenciar as amostras do grupo 2 das do grupo 3. A resposta inflamatória permaneceu maior no grupo 1. Demonstrou-se que o

tratamento com ácido cítrico diminuiu a patogenicidade dos fragmentos radiculares e que o PDGF-BB parece ser capaz de estimular o reparo do tecido conjuntivo e proporcionar uma maior deposição de fibras.

LANDRY et al.⁵⁵, em 1999, observaram com este estudo a efetividade de remoção de substâncias da superfície da raiz e a rugosidade superficial, quando do ato de instrumentação com uma cureta de Gracey 1/2 e uma cureta teste de Gracey Sub-O Curvette de lâmina menor. Foram selecionados 12 alunos de odontologia daquela universidade e cada um recebeu uma cureta e um manequim com dentes plásticos com a superfície radicular coberta com tinta. Os alunos foram instruídos a raspar os dentes anteriores superiores do manequim sendo metade com cureta 1/2 e metade com a cureta teste. Observou-se que nas regiões mais profundas, de 4 a 6mm de profundidade de sondagem, as curetas menores (curetas teste) foram mais efetivas na retirada de material da superfície radicular que as curetas 1/2, porém produziram uma superfície mais rugosa quando os dentes foram analisados no perfilômetro (em torno de 0,27 µm maior). Os autores concluíram que mais vale a experiência clínica do operador do que o instrumento utilizado.

No mesmo ano, ROMPEN; GOFFINET; NUSGENS⁹⁰ analisaram o comportamento de fibroblastos humanos, extraídos e cultivados, sobre superfícies de dentina condicionadas com ácido cítrico e tetraciclina HCl. As células cultivadas foram obtidas em dentes humanos sadios, extraídos por

indicação ortodôntica. Foram preparados fragmentos de dentes extraídos por indicação periodontal os quais foram confeccionados da seguinte forma: a coroa e o ápice dos dentes foram seccionados e descartados; o remanescente foi submetido à limpeza da superfície com brocas e condicionadas com ácido cítrico a 3% por 3 minutos e tetraciclina HCl a 2,5% por 3 minutos. Os critérios para análise de resultados foram aderência à superfície, proliferação e síntese de proteínas pelos fibroblastos. Os períodos de análise foram: 1, 2, 4, 24 e 48 horas após a colocação dos fragmentos dentais nos meios de cultura. O critério de aderência foi analisado em microscopia eletrônica de varredura e os resultados dos dois condicionantes foi significativamente maior do que os da dentina sem tratamento, porém sem diferença entre eles. O critério de proliferação foi analisado segundo a incorporação de uma proteína (^3H - thymidine), necessária para a mitose destes fibroblastos. Os resultados foram também significativamente maiores para os dois condicionamentos do que para a dentina sem tratamento. O critério de síntese de proteínas foi analisado pela quantidade de colágeno produzido pelos fibroblastos. Quando do uso da tetraciclina HCl, a produção foi 3 vezes maior do que quando não havia condicionamento e, quando do uso do ácido cítrico, a produção de colágeno foi 6 vezes maior do que quando não havia condicionamento. Os autores concluíram observando que estes resultados não podem ser extrapolados para situações "in vivo", porém sugerem que o condicionamento é benéfico, pois induz à aderência, proliferação e síntese protéica, pré-requisitos para a regeneração periodontal.

BAKER et al.¹⁴, em 2000, desenvolveram um modelo de estudo para avaliar a influência dos protocolos de condicionamento da superfície radicular, na absorção e adesão de sangue na superfície dentinária. Compararam através de microscopia eletrônica de varredura, o efeito do condicionamento da dentina da superfície radicular com ácido cítrico e a superfície dentinária radicular que foi tratada apenas com raspagem e alisamento radicular. Blocos de dentina foram cortados e imersos em solução de ácido cítrico durante 5 minutos (grupos experimentais) e após foram embebidos em sangue durante 20 minutos. Através da análise em microscopia, observaram que as superfícies tratadas com ácido cítrico apresentavam uma fina camada de fibrina diretamente aderida, com elementos celulares imersos, na maioria eritrócitos. Por outro lado, nas superfícies não tratadas com ácido cítrico, a dentina aplainada demonstrava aparência amorfa com esparsas proteínas adsorvidas e pouca aderência de eritrócitos.

BASTOS NETO¹⁷, em 2002, analisou em microscopia eletrônica de varredura as superfícies radiculares de dentes humanos hígidos e acometidos pela doença periodontal, antes e após os tratamentos de raspagem e alisamento radicular, condicionamento com ácido cítrico e EDTA. Para tal, foram utilizados 14 dentes humanos, sendo dois hígidos e doze extraídos por perda de suporte periodontal. Os dentes foram preparados para que, de cada raiz, se obtivessem dois corpos de prova. Os

28 corpos de prova foram divididos em 6 grupos e tratados como a seguir: grupo 1) 4 corpos de prova provenientes de dentes hígidos não receberam tratamento; grupo 2) 5 corpos de prova provenientes de dentes contaminados não receberam tratamento; grupo 3) 5 corpos de prova provenientes de dentes contaminados, foram raspados com curetas manuais; grupo 4) 5 corpos de prova provenientes de dentes contaminados foram raspados e condicionados com ácido cítrico (solução líquida a 37% e pH 1); grupo 5) 5 corpos de prova provenientes de dentes contaminados foram raspados e condicionados com EDTA (solução líquida a 24% e pH 7,2); e grupo 6) 4 corpos de prova provenientes de dentes contaminados foram raspados e condicionados com EDTA (gel a 24% e pH 7,1). Pode-se observar que: grupo 1) os corpos de prova apresentaram uma superfície com grânulos regulares, representando as fibras do ligamento periodontal rompidas durante a exodontia. Não havia alterações cementárias ou áreas sem cimento; grupo 2) os corpos de prova dos dentes contaminados pela doença periodontal apresentaram massas de cálculo bastante poroso, margeado por regiões de cimento de aparência normal e áreas de reabsorção cementária; grupo 3) as superfícies dos corpos de prova raspadas com curetas manuais apresentaram uma massa amorfa cobrindo os tecidos dentários caracterizada como *smear layer*. Estrias paralelas impressas na *smear layer* puderam ser observadas; grupo 4) a *smear layer* foi removida pela ação do ácido cítrico. As estruturas do cimento e da dentina podiam ser observadas e fibras colágenas foram expostas; grupo 5) o EDTA em solução líquida não foi efetivo na remoção total da *smear layer*,

que cobria parcialmente as estruturas cementárias e dentinárias; grupo 6) o EDTA gel foi tão efetivo na remoção da *smear layer* e na exposição de fibras colágenas, quanto o ácido cítrico.

PROPOSIÇÃO *

3 PROPOSIÇÃO

Face à possibilidade de utilização do laser de Er:YAG, como alternativa na terapia mecânica radicular periodontal e devido à necessidade de se analisar a influência da sua ação nas superfícies radiculares, foi proposto:

- Avaliar histologicamente, pela análise subjetiva e morfométrica em microscopia óptica, a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de rato, a partir da implantação de fragmentos radiculares de dentes humanos comprometidos por doença periodontal, tratados com laser de Er:YAG comparando-se ao método convencional de raspagem e alisamento radicular feito com curetas e em associação com a aplicação de ácido cítrico;
- avaliar ainda, em microscopia óptica, a concentração de células, formação e orientação das fibras colágenas adjacentes à raiz e a possível presença de inserção de fibras na superfície dos fragmentos radiculares, nos diferentes grupos de tratamento;
- analisar a topografia das superfícies radiculares, nos diferentes grupos de tratamento, pela microscopia eletrônica de varredura.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos dentes

Foram utilizados 15 dentes humanos, condenados por razões periodontais, que após a extração foram armazenados em recipiente com soro fisiológico, em uma temperatura de 4°C, por no máximo 2 meses. Os dentes foram provenientes das clínicas da disciplina de Periodontia da FOB-USP, com a devida indicação de extração, sem qualquer possibilidade de tratamento.

4.2 Preparação dos fragmentos

Os dentes foram preparados para obtenção de fragmentos com dimensões padronizadas de aproximadamente 4mm de comprimento, 2mm de largura e 2mm de espessura e foram derivados de áreas contaminadas, cuja superfície era plana, sem a presença de sulcos ou depressões anatômicas. Inicialmente realizou-se uma demarcação com lápis na área de união amelo-cementária. Para facilitar e possibilitar os cortes com precisão, os dentes foram fixados na sua porção mais apical com o auxílio de uma pinça hemostática. Os dentes foram então seccionados com um disco diamantado cerca de 2mm apical a demarcação. Este corte, perpendicular ao longo eixo do dente, separou a porção coronária da porção radicular. Um segundo corte, paralelo ao primeiro foi realizado à 2mm apicalmente, permitindo a obtenção de uma “fatia” de dente que foi seccionada paralelamente ao longo eixo do dente em 2 partes, possibilitando a obtenção de 2 fragmentos. A superfície pulpar foi marcada com uma ponta esférica diamantada número 1016, para permitir identificação clínica e histológica das

superfícies. Todas as dimensões dos fragmentos foram mensuradas com auxílio de um especímetro. (Figuras 1A ,1B e 1C)

FIGURA 1- **A-** Esquema para a confecção dos espécimes; **B-** Esquema das dimensões dos espécimes; **C-** Fotografia de um espécime preparado.

Após a confecção dos fragmentos, estes foram armazenados em frascos contendo soro fisiológico estéril e mantidos em geladeira. Os fragmentos foram então submetidos a diferentes tratamentos. No total foram utilizados 60 fragmentos.

4.3 Laser de Érbio

Foi utilizado o aparelho de Er:YAG (KEY LASER 2, da Kavo) do Centro de estudos do Laser da Universidade do Sagrado Coração – Bauru, (Fig. 2A e 2B) que possui comprimento de onda de $2,94\mu\text{m}$, atua em modo

pulsado e seu sistema de entrega de energia se faz por fibras ópticas. A ponta nº 2056 de quartzo, (0,5 x 1,8) (Fig. 2C e 2D) desenvolvida para periodontia, foi utilizada posicionada em 45 graus com a superfície radicular. A taxa de repetição utilizada foi de 10 pulsos por segundo. A irradiação com o laser de Er:YAG foi feita com irrigação por água e foi utilizado um sugador de alta potência para coleta dos resíduos. A manipulação das amostras, durante a utilização do laser, foi realizada com o uso de luvas, máscaras e óculos de proteção especial, em local fechado com sinal de advertência na porta. A utilização do aparelho de laser seguiu rigidamente as normas de segurança.^{61,74}

FIGURA 2 – A- Aparelho Laser Er:YAG; **B-** Painel do aparelho; **C-** Contra-ângulo com a ponta de quartzo; **D-** Ponta de quartzo usada para periodontia (nº 2056).

4.4 Grupos Experimentais

Foram utilizados 15 fragmentos para cada grupo de tratamento. Os grupos experimentais foram divididos em:

Grupo 1- A superfície de todo o fragmento foi irradiada com laser de Er:YAG, na forma de varredura, com 60 mJ e taxa de repetição de 10 pulsos

por segundo, durante 15 segundos. Em seguida os fragmentos foram irrigados, durante 30 segundos, com soro fisiológico em seringa descartável estéril (Fig. 3).

Grupo 2- A superfície de todo o fragmento foi irradiada com laser de Er:YAG, na forma de varredura, com 100 mJ e taxa de repetição de 10 pulsos por segundo, durante 15 segundos. Em seguida os fragmentos foram irrigados, durante 30 segundos, com soro fisiológico em seringa descartável estéril (Fig. 3).

Grupo 3- foi realizado raspagem e alisamento radicular com 20 golpes de cureta nova e devidamente afiada (Gracey número 5-6, Hu-Friedy), seguido da aplicação de ácido cítrico (50%) com tetraciclina gel (Decalcific-Biotechnol, Bauru-SP) pH 1, por 3 minutos. A aplicação do ácido foi feita com uma bolinha de algodão estéril contra a superfície radicular. Em seguida os fragmentos foram irrigados, durante 30 segundos, com soro fisiológico em seringa descartável estéril (Fig. 4).

Grupo 4 - foi realizado apenas raspagem e alisamento radicular com 20 golpes de cureta nova e devidamente afiada (Gracey número 5-6, Hu-Friedy) e lavagem com soro fisiológico em seringa descartável estéril, durante 30 segundos (Fig.5).

Para permitir todos os procedimentos acima mencionados, os fragmentos foram fixados com auxílio de uma pinça hemostática.

Visando respeitar as normas de segurança para a utilização do laser, como a minimização de superfícies refletoras, realizou-se um jateamento com óxido de alumínio na ponta da pinça hemostática (Fig. 3). Todos os procedimentos foram realizados com utilização de instrumental e luvas

estéreis. Após realizados os tratamentos, os espécimes já tratados foram armazenados em frascos estéreis contendo soro fisiológico estéril e em geladeira.

FIGURA 3- Fragmento radicular sendo tratado com laser de Er:YAG (grupos 1 e 2).

FIGURA 4- Fragmento radicular recebendo aplicação de ácido cítrico com tetraciclina, após prévio tratamento de raspagem e alisamento radicular (grupo 3).

FIGURA 5- Fragmento sendo tratado com raspagem e alisamento radicular com cureta (grupo 4).

Experimento I

4.5 Implantação dos fragmentos em tecido subcutâneo de ratos

Os fragmentos submetidos aos diferentes tratamentos foram introduzidos em tecido conjuntivo subcutâneo de rato. Foram utilizados 15 ratos adultos machos, da raça Wistar (*Rathus norvegicus* – Var. *albinus rodentia mammalia*), pesando cerca de 160 gramas, com aproximadamente 2 meses de vida (Fig. 6A).

Os animais receberam uma dieta constituída de ração e água fornecidos à vontade. Os animais foram anestesiados pela aplicação intraperitoneal de Dopalen (Cloridrato de Quetamina) e Anasedan (Cloridrato de Xilazina) na dosagem de 0,1 + 0,1 ml / 100g de massa corporal, seguida de tricotomia feita com tesoura de ponta romba e anti-sepsia com álcool 70% v/v. As incisões foram feitas com lâmina de bisturi número 15 (Bard-Parker) e a aponeurose foi divulsionada com tesoura de ponta romba, para que os fragmentos pudessem ser inseridos no tecido conjuntivo subcutâneo dos animais. Para cada rato, foi implantado um fragmento de cada grupo de tratamento, de forma que quatro fragmentos foram colocados na região dorsal de cada animal. Os fragmentos foram colocados suficientemente distantes entre si para não haver interferências das respostas locais (Fig. 6B, 6C e 6D).

FIGURA 6A- Rato da raça Wistar após procedimento de tricotomia.

FIGURA 6B- Incisões feitas no dorso do rato.

FIGURA 6C- Divulsão com tesoura de ponta romba.

FIGURA 6D- Implantação do fragmento no subcutâneo do rato.

As incisões foram suturadas com fio de seda 4.0 montado em agulha curva.(Ethicon) Cinco animais foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo, sendo 7, 14 e 28 dias após a introdução dos fragmentos. O sacrifício foi feito com uma dose excessiva de vapor de éter etílico e as peças de tecido conjuntivo associadas aos fragmentos radiculares foram obtidas através de incisão ampla, facilitando a localização dos fragmentos implantados e a preservação do tecido circunjacente.

4.6 Processamento do material

Após remoção das peças mais os fragmentos radiculares foram processadas da seguinte maneira:

- Fixação em solução de formol a 10% em tampão fosfato a 0,1M, pH 7,2, por um período de 72 horas à temperatura ambiente;
- Lavagem em água corrente por quatro horas;
- Desmineralização, em solução de Morse, por um tempo total de ± 45 dias
- Desidratação padronizada em série crescente de etanol à 70% até o absoluto, diafanização em xilol e inclusão em resina paraplast, segundo a rotina do Laboratório de Histologia da FOB (USP);
- Corte semi-seriado, feito num plano paralelo ao longo eixo das peças, com o micrótomo de rotação calibrado para espessura de 5 μm , obtidos em intervalos de 50 μm ;
- Coloração pela técnica de hematoxilina-eosina (HE)

4.7 Análise Histológica e Morfométrica

Foi utilizado o microscópio de luz Olympus CH-2, com objetivas de 4X, 10X e de 40X, para análise histológica e com objetiva de imersão de 100X, para análise morfométrica. A área analisada em cada corte histológico foi a área imediatamente adjacente à superfície do fragmento contrária à marcação que foi feita com a broca esférica, o que correspondeu a superfície anteriormente voltada para a área de infecção periodontal.

A análise histológica consistiu de um exame subjetivo das fibras colágenas formadas junto aos fragmentos, observando-se a disposição, a direção e a densidade do tecido conjuntivo.

Na análise morfométrica (estereológica) foram avaliados a densidade de volume das células e estruturas nas proximidades de cada fragmento,

bem como o número de perfis de célula por área, utilizando-se de um retículo ou grade de integração II Zeiss, colocado em uma ocular de compensação Kpl 8X Zeiss. No retículo, está impresso um sistema-teste delimitado por um quadrado localizado na região central (Fig. 7). A área do sistema-teste estendeu-se do intervalo das linhas 3 e 4 ao intervalo das linhas 8 e 9, assim como do intervalo entre as colunas 3 e 4 até o intervalo entre as colunas 8 e 9 do retículo. No total este quadrado central contém 5 linhas paralelas, marcadas cada uma por 5 pontos equidistantes.

Calculou-se com a objetiva de 100X, as dimensões da área trabalhada, utilizando uma lâmina calibrada em micrômetro (Zeiss).

Cada lado do sistema-teste possui $62,5\mu\text{m}$. Portanto, a área trabalhada foi de $3906,25\mu\text{m}^2$.

FIGURA 7- Retículo de Integração II de Zeiss

4.8 Casualização dos Campos

A análise das estruturas sólidas do corpo segue princípios geométrico-estatísticos, derivados da probabilidade, tendo como ponto fundamental a casualização das amostras, ou seja, a escolha das amostras

do tecido deve ser realizada por um método que elimine a ocorrência de vício na amostragem.¹¹¹ Isto é conseguido com a aplicação de procedimentos de casualização em todos os estágios do experimento, desde a escolha dos animais, a seleção dos cortes histológicos e seleção dos campos microscópicos a serem utilizados nas quantificações. De cada fragmento processado, foram sorteados cinco cortes histológicos, sendo analisados quatro campos de cada corte. Assim, foram utilizados para cada fragmento um total de 20 campos⁷⁰, escolhidos por casualização sistemática¹¹¹, onde o sistema-teste delimitado no retículo foi colocado sobre o campo histológico em intervalos regulares. A figura 8 é um exemplo do esquema que foi utilizado para a casualização dos campos. Neste caso, como a extensão total da superfície de análise corresponde a 20 áreas do sistema-teste e como em cada corte foram selecionados quatro campos, então a cada intervalo de quatro campos, o quinto foi escolhido para análise.⁷⁰

FIGURA 8 – Exemplo do esquema de casualização sistemática.

4.9 Teste de Homogeneidade da amostra

Com a finalidade de se verificar a homogeneidade (isotropia) da amostra, ou seja, se todos os elementos teciduais estão devidamente representadas nas contagens pelo esquema de casualização sistemática adotado, ao invés de 20 campos padronizados foram contados 40 campos microscópicos em um dos grupos escolhidos aleatoriamente. Os resultados dos primeiros 20 campos foram confrontados com os outros 20 seguintes pelo teste de Qui-Quadrado (χ^2) múltiplo, segundo indicações de MORONEY⁶⁵, ALVARES⁶ e PARDINI⁷¹. Neste tipo de teste, a partir dos resultados das duas séries de contagens do número de pontos (por exemplo) de cada estrutura, são calculados os valores esperados correspondentes. O χ^2 para cada estrutura foi obtido através da relação: $\chi^2 = \frac{(\alpha - \beta)^2}{\beta}$ onde,

$$\beta$$

α = valor observado e β = valor esperado. Para que a amostra seja homogênea a soma de todos os valores de χ^2 não deve ultrapassar o valor do χ^2 crítico. O nível de probabilidade do χ^2 crítico foi estabelecido em 5%. Nesse caso, a comprovação da homogeneidade da amostra indica que 20 campos microscópicos casualizados são suficientes para a obtenção da densidade de volume. O teste foi aplicado também para a obtenção do número de perfis de núcleos celulares.

4.10 Avaliação da densidade de volume e do número de células por mm².

Em cada grupo, 20 campos microscópicos selecionados por casualização sistemática foi sobreposto o retículo de integração II de Zeiss e anotados o número de pontos (Pi) sobre cada componente tecidual (células, fibras, vasos) e o número total de pontos (Pt) por grupo experimental. A densidade de volume (Vvi) de cada componente foi: $Vvi = \frac{Pi}{Pt}(\%)$. (RUSS; DEHOFF, 2000) ⁹⁴

Como o citoplasma do fibroblasto e as fibras colágenas apresentam a mesma coloração pela Hematoxilina e Eosina, para efeito de densidade de volume esses dois componentes foram considerados juntos, inclusive para os pontos que caíram sobre o núcleo do fibroblasto.

Para o número de células foi contado o número de perfis dos núcleos celulares vistos no campo microscópico delimitado pela área trabalhada no retículo. O número de perfis celulares foi expresso por mm².

4.11 Análise Estatística

Todos os dados morfométricos foram confrontados estatisticamente a fim de se comparar os grupos de tratamento dentro de um mesmo período de reparo e para verificar se houve diferença de cada entidade dentro de um mesmo grupo de tratamento, mas em períodos diferentes de reparo. Foi realizada a análise de variância (ANOVA), confrontando-se as 4 variáveis (grupos de tratamento) para o período de 7, 14 e 28 dias, assim como foram avaliados os valores de cada grupo confrontando-se os dados de 7 dias com

os de 14 e os de 28 dias. Quando houve diferença estatisticamente significativa, foi aplicado o teste de Tukey. Os cálculos estatísticos foram realizados com o auxílio do programa de análise estatística Sigma Stat.

No caso da densidade de volume, os testes estatísticos foram realizados após transformação arco-seno dos dados originais, uma vez que estes valores sendo porcentagem poderiam não apresentar distribuição normal e portanto, não seriam passíveis de testes estatísticos que pressupõem normalidade das variáveis.

Experimento II

4.12 Análise das superfícies radiculares em Microscopia Eletrônica de Varredura. (MEV)

Seguindo os mesmos procedimentos descritos para preparação dos fragmentos, foram obtidos 5 fragmentos para cada grupo experimental, com o objetivo de comparar topograficamente as superfícies submetidas aos diferentes tratamentos.

Para possibilitar essa análise, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (ZEISS DSM 940A) do Núcleo de Apoio à Pesquisa da ESALQ/USP de Piracicaba-SP. Os espécimes foram colados em “stubs” metálicos e submetidos a uma cobertura metálica por “sputtering” de ouro, cuja espessura é em geral da ordem de 100-200 Å (Fig. 9A e 9B)

Após a metalização, os espécimes foram analisados no microscópio eletrônico de varredura em diferentes aumentos. As imagens obtidas foram capturadas em um computador, sendo portanto, digitalizadas.

Avaliou-se comparativamente as características superficiais de cada grupo de tratamento.

FIGURA 9A- Fragmento fixado no “stub” metálico.

FIGURA 9B- Fragmento metalizado com ouro para análise em MEV.

RESULTADOS *

5 RESULTADOS

Experimento I

5.1 Análise Histológica (Microscopia óptica)

A análise histológica do tecido conjuntivo adjacente aos fragmentos radiculares submetidos aos diferentes tratamentos levou em consideração as características e grau de organização do tecido conjuntivo, bem como a presença de células predominantes em cada período avaliado.

5.1.1 Período de 7 dias

No grupo tratado com o laser de Er:YAG, durante 15 segundos, com energia de 60 mJ e 10 pps (grupo 1), nota-se a presença de infiltrado inflamatório intenso que se estende por toda área adjacente à superfície do fragmento, com predomínio de células mononucleares, entretanto alguns polimorfonucleares são encontrados. Há grande vascularização e as fibras colágenas encontram-se recém formadas e imaturas, não apresentando orientação definida. Essas fibras estão em contato com a superfície radicular que apresenta algumas irregularidades. Fibroblastos e células inflamatórias são também encontradas nas proximidades das superfícies dos fragmentos radiculares (Fig. 10 e Fig. 11).

No grupo tratado com o laser de Er:YAG, durante 15 segundos, com energia de 100 mJ e 10 pps (grupo 2), observa-se infiltrado inflamatório intenso estendendo-se por toda área adjacente à superfície do fragmento, havendo predomínio de células mononucleares. As fibras colágenas recém formadas apresentam-se imaturas e adotaram, de forma geral, uma posição mais paralela à superfície radicular, com grau de organização pouco

definido. Essas fibras estão em contato com as superfícies radiculares dos fragmentos, observando-se fibroblastos e fibras próximos a essas superfícies. Nota-se ainda intensa vascularização (Fig. 12 e Fig. 13).

No grupo onde se realizou raspagem seguida da aplicação de ácido cítrico gel com tetraciclina (grupo 3), observa-se, diferentemente dos demais grupos, que a orientação das novas fibras colágenas em formação encontram-se perpendiculares ou oblíquas a superfície radicular tratada. Muitas células com características fusiformes e mononucleares sugerem a presença de fibroblastos próximos à superfícies dos fragmentos. Há presença de um grande número de vasos e o infiltrado inflamatório é intenso, estendendo-se por toda área adjacente ao fragmento radicular, havendo predomínio de células mononucleares. (Fig. 14 e Fig. 15)

No grupo onde apenas a raspagem manual foi utilizada como tratamento (grupo 4), adjacente a superfície dos fragmentos, nota-se que as fibras colágenas são recém formadas e adotaram posição paralela a superfície radicular. Não há evidências de células, como fibroblastos, em contato com a superfície do fragmento. O infiltrado inflamatório presente é intenso e se estende por toda superfície dos fragmentos com predomínio de células mononucleares. Esse tecido também é altamente vascularizado. Observa-se que algumas células inflamatórias encontram-se em contato com a superfície radicular tratada (Fig. 16 e Fig. 17).

De forma geral todos os grupos apresentaram infiltrado inflamatório intenso, neste período. Entretanto o grupo 3 diferiu os demais por apresentar fibras colágenas com orientação perpendicular ou oblíqua à superfícies radiculares. Nos demais grupos observou-se orientação paralela ou indefinida das fibras.

FIGURA 10- Fotomicrografia da área adjacente à superfície radicular do grupo 1 (laser de Er:YAG com 60 mJ, 10 pps, 15s.) sete dias após a implantação, mostrando a presença de infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares. Nota-se grande vascularização e as fibras colágenas adjacentes à superfície radicular encontram-se desorganizadas. (H.E. 400X) V= vaso, F= fibras colágenas.

FIGURA 11- Fotomicrografia em maior aumento da área demarcada na figura 10 (grupo 1) mostrando o padrão de organização das fibras colágenas em formação adjacentes à superfície radicular que apresenta aspecto irregular e algumas células inflamatórias presentes. (H.E. 1000X). V= vaso, Setas= fibras colágenas.

FIGURA 12- Fotomicrografia da área adjacente à superfície radicular do grupo 2 (laser com 100 mJ, 10 pps, 15s.), sete dias após a implantação, onde nota-se presença de infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares, tecido rico em vasos e fibras colágenas sem orientação definida. (H.E. 400X). V= vaso, F= fibras colágenas.

FIGURA 13- Fotomicrografia da área demarcada na figura 12 (grupo 2), mostrando, em maior aumento, a presença do infiltrado inflamatório, células fusiformes caracterizando fibroblastos e observa-se fibras colágenas recém formadas, pouco definidas quanto a sua orientação, com áreas que sugerem paralelismo entre as fibras e a superfície radicular. (H.E. 1000X). V= vaso, Setas = fibroblastos.

FIGURA 14- Fotomicrografia da área adjacente à superfície radicular do grupo 3 (ácido cítrico com tetraciclina, por 3 min.) sete dias após a implantação, mostrando a característica das fibras recém formadas em contato com a superfície radicular tratada. Nota-se que a organização das fibras estão mais definidas e a orientação das mesmas seguem um padrão oblíquo ou perpendicular à superfície radicular. Há grande vascularização e infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares. (H.E. 400X). V= vaso, F= fibras colágenas.

FIGURA 15- Fotomicrografia da área demarcada na figura 14 (grupo 3), em maior aumento, mostrando a orientação das fibras colágenas em formação oblíquas e perpendiculares à superfície radicular tratada (H.E. 1000X). Setas = fibras colágenas.

FIGURA 16- Fotomicrografia da área adjacente à superfície radicular do grupo 4 (raspagem e alisamento radicular com cureta) sete dias após a implantação, onde observa-se presença de infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares e alguns polimorfonucleares. Há grande vascularização e as fibras recém formadas tem orientação paralela à superfície radicular. (H.E. 400X). V= vaso, Setas= fibras colágenas.

FIGURA 17- Fotomicrografia da área adjacente à superfície radicular do grupo 4 (raspagem e alisamento radicular com cureta, em maior aumento, mostrando a orientação paralela das fibras recém formadas em relação à superfície radicular. Nota -se grande número de células inflamatórias e vasos. (H.E. 1000X). V= vaso, Setas= fibras colágenas.

5.1.2 Período de 14 dias

No grupo 1, observa-se um infiltrado inflamatório intenso, semelhante ao primeiro período de reparo, com predomínio de macrófagos. A vascularização presente ainda foi intensa, entretanto houve maturação das fibras colágenas quando comparado ao período de 7 dias de reparo, pois as mesmas apresentaram-se mais organizadas, definindo uma orientação perpendicular ou oblíqua a superfície radicular. Em algumas áreas houve um íntimo contato das fibras colágenas com as superfícies sugerindo a adesão de fibras à superfície radicular (Fig. 18 e Fig. 19).

No grupo 2, neste período, houve maturação do tecido em reparo comparado ao período de 7 dias. A diferença mais evidente está na orientação das fibras colágenas formadas, que anteriormente adotaram posições indefinidas ou até mesmo paralelas à superfície. Neste período notou-se que as fibras conjuntivas adotaram posicionamento oblíquo a superfície radicular e pode-se observar a presença de células fusiformes, características de fibroblastos, em contato com a superfície radicular, podendo sugerir uma provável adesão dessas novas fibras. Houve diminuição do infiltrado inflamatório que se apresentou discreto quando comparado ao primeiro período de reparo, com presença de alguns macrófagos, podendo-se salientar que o tecido se apresenta mais organizado. A vascularização foi menos intensa que no período anterior (Fig. 20 e Fig. 21).

No grupo 3, não houve mudanças tão marcantes quando comparado ao período de sete dias de reparo. Observa-se na região mais próxima à

superfície radicular que as fibras colágenas recém formadas estão em processo de maturação. Algumas fibras encontram-se oblíquas à superfície radicular. Não há células do tipo fibroblasto em contato com a superfície radicular. O infiltrado inflamatório apresentou-se moderado com predomínio de células mononucleares. Houve menor vascularização quando comparado ao período de sete dias. (Fig. 22 e Fig. 23)

No grupo 4, observou-se maior fibrosamento do tecido conjuntivo, quando comparado a todos os outros grupos, no período de 14 dias de reparo. Em nenhum dos fragmentos tratados desse grupo, neste período, houve a manutenção do tecido conjuntivo em contato com a superfície radicular. O grande número de células fusiformes achatadas e delgadas sugerem se tratar de fibroblastos e as fibras dispostas paralelas à superfície radicular caracterizam um tecido altamente fibrosado. A falta de interação entre o tecido conjuntivo e a superfície radicular pode ser explicada pela presença de células do infiltrado inflamatório que impediram a adesão de fibras conjuntivas às superfícies. A vascularização presente foi menos intensa, quando comparada ao período anterior, assim como o infiltrado inflamatório que se apresentou moderado, com predomínio de macrófagos (Fig. 24).

De forma geral, os grupos 1, 2 e 3 apresentaram semelhanças quanto a interação do tecido conjuntivo e a superfície dos fragmentos radiculares, neste período de reparo, principalmente em relação a orientação das fibras colágenas. Apenas o grupo 4 diferiu em relação a essa interação tecidual, como já comentado anteriormente.

FIGURA 18- Fotomicrografia da área adjacente à superfície radicular do grupo 1 (laser de Er:YAG com 60 mJ,10 pps,15s.), 14 dias após a implantação. Observa-se presença de infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares. Houve maturação das fibras colágenas que adotaram um posicionamento perpendicular ou oblíquo à superfície radicular. (H.E. 400X). V= vaso, Setas= fibras colágenas.

FIGURA 19- Fotomicrografia da área adjacente à superfície radicular do grupo 1 (laser de Er:YAG com 60 mJ,10 pps,15s.), em maior aumento, 14 dias após a implantação, mostrando a orientação perpendicular ou oblíqua das fibras colágenas formadas em relação à superfície radicular. Nota-se presença de fibroblastos e células inflamatórias mononucleares. (H.E.1000X). Setas= fibras colágenas. M= macrófago.

FIGURA 20- Fotomicrografia da área adjacente à superfície radicular do grupo 2 (laser de Er:YAG com 100 mJ, 10 pps, 15s.), 14 dias após a implantação. Houve maturação do tecido em reparo comparado ao período de 7 dias. A diferença mais evidente está na orientação das fibras colágenas formadas que adotaram posicionamento oblíquo à superfície radicular. Nota-se maior grau de organização tecidual. (H.E. 400X). Setas= fibras colágenas.

FIGURA 21- Fotomicrografia da área adjacente à superfície radicular do grupo 2 (laser de Er:YAG com 100mJ, 10pps, 15s.), em maior aumento, 14 dias após a implantação. Observa-se a orientação oblíqua das fibras colágenas formadas em relação à superfície radicular. Há presença de fibroblastos em contato com a superfície radicular, sugerindo possível adesão de fibras. (H.E. 1000X). F= fibroblasto, Setas= fibras colágenas.

FIGURA 22- Fotomicrografia da área adjacente à superfície radicular do grupo 3 (ácido cítrico com tetraciclina, por 3 min.), 14 dias após a implantação. Observa-se na região mais adjacente e próxima a superfície radicular, que de fibras colágenas recém formadas estão em processo de maturação. Algumas fibras encontram-se oblíquas à superfície radicular. (H.E. 400X). V= vaso, Setas= fibras colágenas.

FIGURA 23- Fotomicrografia da área adjacente à superfície radicular do grupo 3 (ácido cítrico com tetraciclina, por 3 min.), em maior aumento, 14 dias após a implantação. Observa-se que as fibras colágenas em maturação adotaram orientação oblíqua em relação à superfície radicular. (H.E. 1000X). Setas= fibras colágenas.

FIGURA 24- Fotomicrografia da área adjacente à superfície radicular do grupo 4 (raspagem e alisamento radicular com cureta), 14 dias após a implantação. Observa-se maior fibrosamento do tecido conjuntivo quando comparado a todos os outros grupos. As fibras estão dispostas paralelas à superfície. Não houve manutenção do tecido conjuntivo em contato com a superfície radicular. (H.E. 400X). Setas= fibras colágenas.

5.1.3 Período de 28 dias

No grupo 1, observou-se que em algumas áreas houve a manutenção da adesão de fibras a superfície radicular. Essas fibras adotaram posição perpendicular ou oblíqua a superfície radicular tratada. O tecido conjuntivo apresentou-se mais maduro, comparado ao período anterior, de 14 dias, com o predomínio de fibroblastos e algumas células inflamatórias mononucleares presentes. O infiltrado inflamatório presente foi discreto e a vascularização foi menor, quando comparada ao período anterior (Fig. 25).

No grupo 2, assim como no grupo 1, pode-se observar algumas áreas de adesão de fibras conjuntivas à superfície radicular. As fibras adotaram posição perpendicular à superfície radicular tratada. Nota-se que alguns fibroblastos estão em contato com a superfície e células inflamatórias mononucleares encontram-se presentes. Também como no grupo 1, observa-se maturação tecidual, havendo diminuição do infiltrado inflamatório, que apresentou-se discreto e com menor vascularização, quando comparado ao período anterior (Fig. 26).

No grupo 3, a presença de fibras posicionadas obliquamente a superfície radicular, sugere que estas estão aderidas a superfície tratada. Observa-se que algumas células fusiformes características de fibroblastos estão presentes em contato com a superfície radicular. Entretanto, ressalta-se que esta adesão não ocorreu ao longo de toda a superfície tratada. O

infiltrado inflamatório é discreto e a vascularização foi menor, assim como nos grupos 1 e 2 (Fig. 27).

Pode-se dizer que o aspecto histológico dos grupos 1, 2 e 3, neste período de reparo foi bastante semelhante, pois nestes grupos observou-se algumas áreas de adesão de fibras à superfícies radiculares.

No grupo 4, observou-se um grande fibrosamento do tecido conjuntivo. Assim como no período de 14 dias, não houve interação entre o tecido conjuntivo e a superfície radicular implantada. Nota-se que os fibroblastos apresentam-se bastante delgados e justapostos, dispostos de modo paralelo à superfície radicular, caracterizando um encapsulamento fibroso. Há um infiltrado inflamatório discreto, com presença de macrófagos e a vascularização presente é semelhante ao período anterior (Fig. 28).

FIGURA 25- Fotomicrografia da área adjacente à superfície radicular do grupo 1 (laser de Er:YAG com 60 mJ, 10 pps, 15s.), 28 dias após a implantação. Há presença de fibras colágenas oblíquas em contato com a superfície radicular, com provável adesão. Nota-se algumas células inflamatórias presentes (H.E. 1000X). Setas= fibras colágenas.

FIGURA 26- Fotomicrografia da área adjacente à superfície radicular do grupo 2 (laser de Er:YAG com 100 mJ, 10 pps, 15s.), 28 dias após a implantação. Observa-se a orientação perpendicular das fibras colágenas em relação à superfície radicular. Há presença de fibroblastos próximos a superfície radicular e há presença de algumas células inflamatórias mononucleares. (H.E. 1000X). Setas= fibras colágenas. M= macrófago.

FIGURA 27- Fotomicrografia da área adjacente à superfície radicular do grupo 3 (ácido cítrico com tetraciclina, por 3 min.), 28 dias após a implantação. Nota-se a presença de fibras colágenas oblíquas à superfície radicular, com possível adesão. (H.E. 400X). Setas= fibras colágenas.

FIGURA 28- Fotomicrografia da área adjacente à superfície radicular do grupo 4 (raspagem e alisamento radicular com cureta), 28 dias após a implantação. Não houve interação do tecido conjuntivo em contato com a superfície radicular. Nota-se característica de encapsulamento fibroso com fibras dispostas paralelas à superfície. (H.E. 400X). Setas= fibras colágenas.

5.2 Análise Morfométrica

5.2.1 Teste de Homogeneidade da amostra

Para o teste de homogeneidade da amostra aplicou-se o teste do qui-quadrado múltiplo (χ^2). Este teste serve para verificar se a amostra é homogênea em relação à frequência das estruturas contadas pelo sistema de casualização sistemática adotado. Quantificou-se a densidade de fibroblastos, de células inflamatórias e de vasos sanguíneos de um fragmento aleatoriamente escolhido em 40 campos microscópicos casualizados. O número de pontos obtidos nos 20 primeiros campos (A), assim como os conseguidos nos 20 campos seguintes (B) estão apresentados na tabela 1.

TABELA 1- Resultado de duas séries de contagens de pontos sobre fibroblastos, de células inflamatórias e de vasos sanguíneos, do fragmento escolhido aleatoriamente.

Campo	Fibroblastos	Células Inflamatórias	Vasos	Total
A	314	63	51	428
B	303	69	58	430
Total	617	132	109	858

A partir dos valores observados na tabela 1, foram calculados os valores esperados, segundo indicações de MORONEY, 1962⁶⁵, como esquematizado na tabela 2.

TABELA 2- Cálculo dos valores esperados.

Campo	Fibroblastos	Células Inflamatórias	Vasos
A	$\frac{428 \times 617}{858}$	$\frac{428 \times 132}{858}$	$\frac{428 \times 109}{858}$
B	$\frac{430 \times 617}{858}$	$\frac{430 \times 132}{858}$	$\frac{430 \times 109}{858}$

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 3.

TABELA 3- Valores esperados.

Campo	Fibroblastos	Células Inflamatórias	Vasos
A	307,78	65,84	54,37
B	309,21	66,15	54,62

A partir dos valores observados e dos valores esperados, calculou-se o qui-quadrado para cada uma das estruturas, os quais se encontram na tabela 4.

TABELA 4- Valores de qui-quadrados obtidos.

Campo	Fibroblastos	Células Inflamatórias	Vasos
A	0,125	0,122	0,202
B	0,124	0,122	0,209

O χ^2 crítico para 2 graus de liberdade, ou seja 3 -1 (n -1) em nível de 5% de erro ($P < 0,05$) é igual a 5,991. Como o valor do χ^2 obtido igual a 0,904 foi menor que o χ^2 crítico, isto significa que as séries de contagens confrontadas são semelhantes, ou seja, a amostra é homogênea utilizando-se o sistema de casualização realizado e os 20 campos contados são suficientes para representa-la.

5.2.2 Densidade de volume e o número de células por mm²

A densidade de volume de cada componente foi calculada de acordo com RUSS; DEHOFF, 2000⁹⁴. Uma vez obtidos os valores de cada componente, foi feita análise de variância para se comparar os grupos de tratamento dentro de um mesmo período de reparo, assim como para avaliar se houve variação de cada grupo entre os períodos de 7, 14 e 28 dias de reparo. O nível de erro para $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente

significante. Os valores médios de cada categoria celular e de vasos sangüíneos estão dispostos nas tabelas a seguir.

A análise estatística dos dados obtidos das amostras para a densidade de fibroblastos nos diferentes períodos de reparo (7, 14 e 28 dias), nos diferentes grupos de tratamento são visualizadas na tabela 5 e no gráfico 1. Não há diferença quanto a densidade de fibroblastos nos diferentes grupos de tratamento, entretanto, nota-se diferença significativa entre os diferentes períodos de reparo, dentro de cada grupo de tratamento.

TABELA 5- Densidade de volume (%) dos fibroblastos nos diferentes grupos de tratamento, nos períodos de 7 , 14 e 28 dias . Médias (M) e Desvio Padrão (DP).

Dens. Vol. dos Fibroblastos (%)	Grupo 1 L60		Grupo 2 L100		Grupo 3 AC		Grupo 4 RAR	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
07 dias	66,81 a*	±3,19	63,05 a	±3,13	66,35 a	±3,01	62,08 a	±4,89
14 dias	67,68 b	±2,39	71,31 b	±1,62	69,54 b	±1,17	67,71 b	±1,74
28 dias	73,24 c	±5,60	75,26 c	±2,01	72,82 c	±2,78	73,62 c	±1,63

*As letras diferentes (a, b, c) denotam diferença estatística entre os períodos de reparo dentro de um mesmo grupo. Letras iguais simbolizam que não houve diferença. (L60- laser 60mJ; L100- laser 100mJ; AC- ácido cítrico; RAR- raspagem e alisamento radicular)

GRÁFICO 1- Densidade de volume (%) de fibroblastos nos diferentes grupos de tratamento, nos períodos de 7, 14 e 28 dias de reparo. (L60- laser 60mJ; L100- laser 100mJ; AC- ácido cítrico; RAR- raspagem e alisamento radicular)

Quanto ao número de fibroblastos por milímetros quadrados, podemos observar na tabela 6 e no gráfico 2, que não houve diferença do número de fibroblastos, entre os diferentes grupos de tratamento. Entretanto houve diferença significativa do número de fibroblastos entre o período de 7 dias comparado aos períodos de 14 e 28 dias. Não houve diferença significativa entre os períodos de 14 e 28 dias de reparo.

TABELA 6- Número de fibroblastos por milímetro quadrado nos diferentes grupos de tratamento, nos períodos de 7, 14 e 28 dias de reparo. Médias (M) e Desvio Padrão (DP)

Número de Fibroblastos (mm ²)	Grupo 1 L60		Grupo 2 L100		Grupo 3 AC		Grupo 4 RAR	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
07 dias	6156,6 a*	±402,8	6241,3 a	±559,2	6417,9 a	±922,1	5504,0 a	±814,7
14 dias	7372,8 b	±734,3	7431,7 b	±801,1	8156,1 b	±796,9	8573,4 b	±597,0
28 dias	8099,8 b,c	±904,5	8133,1 b,c	±416,9	9141,7 b,c	±1101,9	8619,5 b,c	±888,9

*As letras diferentes (a, b, c) denotam diferença estatística entre os períodos de reparo dentro de um mesmo grupo. Letras iguais simbolizam que não houve diferença. (L60- laser 60mJ; L100- laser 100mJ; AC- ácido cítrico; RAR- raspagem e alisamento radicular)

GRÁFICO 2- Número de Fibroblastos por mm² nos diferentes grupos de tratamento, nos períodos de 7, 14 e 28 dias de reparo. (L60- laser 60mJ; L100- laser 100mJ; AC- ácido cítrico; RAR- raspagem e alisamento radicular)

Quanto a densidade de células inflamatórias presentes nos diferentes grupos de tratamento nos períodos de reparo propostos, observamos na tabela 7 e no gráfico 3 que não houve diferença estatística significativa da densidade de células inflamatórias entre os diferentes grupos de tratamento. Observou-se diferença significativa entre todos os períodos de reparo, dentro de cada grupo de tratamento individualmente.

TABELA 7- Densidade de volume (%) de células inflamatórias nos diferentes grupos de tratamento, nos períodos de 7, 14 e 28 dias de reparo.

Densidade de Vol. de Células Inflamatórias (%)	Grupo 1 L60		Grupo 2 L100		Grupo 3 AC		Grupo 4 RAR	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
07 dias	17,73 a*	±3,50	19,14 a	±4,15	16,29 a	±3,21	20,34 a	±5,12
14 dias	16,30 b	±3,11	14,36 b	±2,01	16,10 b	±1,19	17,68 b	±2,14
28 dias	9,41 c	±2,32	7,73 c	±1,71	11,03 c	±3,63	7,39 c	±4,23

*As letras diferentes (a, b, c) denotam diferença estatística entre os períodos de reparo dentro de um mesmo grupo. Letras iguais simbolizam que não houve diferença. (L60- laser 60mJ; L100- laser 100mJ; AC- ácido cítrico; RAR- raspagem e alisamento radicular)

GRÁFICO 3- Densidade de volume (%) de células inflamatórias nos diferentes grupos de tratamento, nos períodos de 7, 14 e 28 dias de reparo. (L60- laser 60mJ; L100- laser 100mJ; AC- ácido cítrico; RAR- raspagem e alisamento radicular)

O número de células inflamatórias por mm² pode ser visto na tabela 8 e no gráfico 4, onde considerou-se o número de macrófagos, neutrófilos, linfócitos

e plasmócitos somados. Houve diferença estatística significativa do número de células inflamatórias no grupo 4, no período de 7 dias, comparado aos grupos 1 e 3. Embora se observe que o número de células inflamatórias mostrou-se maior no grupo 4, não houve significância estatística em relação ao grupo 2. No grupo 1, observou-se diferença entre os períodos de 28 dias, comparado aos períodos de 7 e 14 dias. No grupo 2, houve diferença significativa entre os períodos de 7 e 28 dias de reparo. Já no grupo 3, a diferença foi encontrada entre os períodos de 28 dias comparado aos de 7 e 14 dias. No grupo 4, houve diferença significativa entre todos os períodos.

TABELA 8- Número de células inflamatórias por milímetro quadrado nos diferentes grupos de tratamento, nos períodos de 7, 14 e 28 dias de reparo.

Nº de Cél. Inflam. /mm ²	Grupo 1 L60		Grupo 2 L100		Grupo 3 AC		Grupo 4 RAR	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
07 dias	1940,4 a*	±416,0	2554,8 a	±1122,7	2063,3 a	±424,8	3724,8 ^{G3,G1} a	±775,3
14 dias	1804,8 a,b	±409,8	1712,6 a,b	±401,4	1937,9 a,b	±170,9	1799,6 b	±498,4
28 dias	913,9 c	±175,8	773,1 b,c	±104,6	970,2 c	±191,4	890,8 c	±87,5

*As letras diferentes (a, b, c) denotam diferença estatística entre os períodos de reparo dentro de um mesmo grupo. Letras iguais simbolizam que não houve diferença. (L60- laser 60mJ; L100- laser 100mJ; AC- ácido cítrico; RAR- raspagem e alisamento radicular)

G1 = Grupo 1; **G3** = Grupo 3. (G1 e G3 foram diferentes do Grupo 4, no período de 7 dias).

GRÁFICO 4- Número de células inflamatórias por mm² nos diferentes grupos de tratamento, nos períodos de 7, 14 e 28 dias de reparo. (L60- laser 60mJ; L100- laser 100mJ; AC- ácido cítrico; RAR- raspagem e alisamento radicular)

Quanto a densidade de vasos, observamos na tabela 9 e no gráfico 5, que não houve diferença estatística significativa entre os grupos de tratamento. Entretanto, notou-se que houve diferença entre os períodos de 7 dias comparados aos períodos de 14 e 28 dias, dentro de cada grupo de tratamento individualmente.

TABELA 9- Densidade de volume (%) de vasos sangüíneos nos diferentes grupos de tratamento nos períodos de 7, 14 e 28 dias de reparo.

Dens. de Vol. de Vasos (%)	Grupo 1 L60		Grupo 2 L100		Grupo 3 AC		Grupo 4 RAR	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
07 dias	13,81 a*	±2,10	17,60 a	±1,60	15,98 a	±1,68	17,60 a	±1,55
14 dias	14,28 b	±1,82	11,18 b	±1,36	12,07 b	±1,76	12,35 b	±4,18
28 dias	13,52 b,c	±5,39	12,41 b,c	±1,67	12,56 b,c	±2,20	14,00 b,c	±1,68

*As letras diferentes (a, b, c) denotam diferença estatística entre os períodos de reparo dentro de um mesmo grupo. Letras iguais simbolizam que não houve diferença. (L60- laser 60mJ; L100- laser 100mJ; AC- ácido cítrico; RAR- raspagem e alisamento radicular)

GRÁFICO 5- Densidade de vasos nos diferentes grupos de tratamento, nos períodos de 7, 14 e 28 dias de reparo. (L60- laser 60mJ; L100- laser 100mJ; AC- ácido cítrico; RAR- raspagem e alisamento radicular)

Experimento II

5.3 Análise de Superfície em Microscopia Eletrônica de Varredura

Grupo 1: Neste grupo, onde realizou-se a aplicação do laser de Er:YAG, com 60 mJ, observa-se que a superfície radicular apresenta aspecto irregular, com túbulos dentinários obliterados. As características superficiais não permitem dizer se a *smear layer* está presente ou foi removida. Não se observou sinais de carbonização que se caracterizam por formações globulares ou amorfas com aspecto de derretimento, fendas ou trincas, entretanto, algumas áreas apresentaram irregularidades na forma de pequenas crateras com camadas escamosas sobrepostas. Em maiores aumentos, algumas áreas sugerem que os túbulos dentinários estão parcialmente abertos (Fig.29 e Fig.30).

Grupo 2: Neste grupo, tratado com laser de Er:YAG com 100 mJ, observa-se áreas de depressões regulares por toda superfície irradiada com o laser. Nota-se aspecto irregular, sem presença de trincas, fendas ou áreas de carbonização. Algumas áreas sugerem a presença de túbulos dentinários parcialmente abertos e a *smear layer* não pode ser claramente identificada. O aspecto morfológico de camadas sobrepostas em forma de escamas pode ser observado nos menores aumentos assim como no grupo 1 (Fig.31 e Fig. 32).

Grupo 3: Este grupo, tratado com ácido cítrico 50% com tetraciclina gel, durante 3 minutos, apresentou características morfológicas uniformes, sem a presença de *smear layer* na superfície radicular. Observou-se também áreas de exposição dos túbulos dentinários que apresentaram-se totalmente abertos e limpos (Fig.33 e Fig.34).

Grupo 4: Neste grupo, o tratamento mecânico radicular realizado com curetas, fez com que se observasse morfolologicamente, alterações na superfície radicular, como as marcações e ranhuras deixadas pela lâmina da cureta, além da presença de áreas remanescentes de *smear layer* não removidas durante a instrumentação (Fig.35 e Fig.36).

Ressalta-se que a presença de trincas nas superfícies do cimento e/ou dentina dos espécimes radiculares utilizados neste experimento, ocorreu devido à desidratação dos fragmentos, durante o processamento para análise no microscópio eletrônico de varredura, sendo portanto, artefatos de técnica. Em todos os grupos notou-se a presença dessas trincas, entretanto uma observação deve ser feita, em relação aos grupos irradiados com o laser de Er:YAG (grupos 1 e 2) onde o número de trincas encontradas nas superfícies dos fragmentos foi bem menor quando comparado aos grupos que receberam outros tratamentos (grupo 3 e 4).

FIGURA 29- Superfície radicular irradiada com laser de Er:YAG, com 60 mJ. (Grupo 1) Nota-se aspecto irregular da superfície com áreas de pequenas crateras. Aumento de 200X. Setas= Crateras

FIGURA 30- Superfície radicular irradiada com laser de Er:YAG, com 60 mJ. (Grupo 1) Observa-se característica irregular de forma escamosa, com áreas sugestivas de túbulos dentinários parcialmente obliterados. Aumento de 500X. Setas= túbulos dentinários parcialmente abertos.

FIGURA 31- Superfície radicular irradiada com laser de Er:YAG, com 100 mJ. (Grupo 2) Superfície apresenta irregularidades e áreas sugerem presença de túbulos dentinários parcialmente abertos. Aumento de 100X. Setas= túbulos dentinários parcialmente abertos.

FIGURA 32- Superfície radicular irradiada com laser de Er:YAG, com 100 mJ. (Grupo 2) Superfície apresenta irregularidades resultantes da ablação. Aumento de 1000X. Setas= irregularidades.

FIGURA 33- Superfície radicular tratada com ácido cítrico e tetraciclina gel por 3 minutos.(Grupo 3) Observa-se uma superfície regular, com áreas de túbulos dentinários expostos pelo condicionamento. Há ausência de *smear layer*. Aumento de 1000X. Setas= túbulos dentinários abertos.

FIGURA 34- Superfície radicular tratada com ácido cítrico e tetraciclina gel por 3 minutos. (Grupo 3) Observa-se a presença de túbulos dentinários completamente abertos, sem presença de *smear layer*. Aumento de 5000X. Setas= túbulos dentinários abertos.

FIGURA 35- Superfície radicular tratada com raspagem e alisamento radicular. (Grupo 4) Observa-se ranhuras deixadas pela lâmina da cureta durante a instrumentação manual. Há presença de *smear layer*. Aumento de 500X. SL= *smear layer*, Setas= ranhuras provocadas pela cureta.

FIGURA 36- Superfície radicular tratada com raspagem e alisamento radicular. (Grupo 4) Nota-se a presença de *smear layer* remanescente ao tratamento mecânico além das fissuras deixadas pela lâmina da cureta. Aumento de 1000X. SL= *smear layer*, Setas= ranhuras provocadas pela cureta.

DISCUSSÃO *

6 DISCUSSÃO

O laser de Er:YAG foi desenvolvido para o uso na odontologia graças à excelente capacidade de ablação dos tecidos duros, devido à grande afinidade pela água e hidroxiapatita. Além disso, este laser não promove danos térmicos locais, se bem empregados ¹¹⁵.

Dadas as características vantajosas, como a ablação, hemostasia e efeito descontaminante, o tratamento com laser de Er:YAG foi proposto como uma alternativa ou adjunto ao tratamento convencional, na terapia mecânica radicular periodontal ^{9,10,29,30,32,114}.

O presente trabalho buscou elucidar os efeitos desse tipo de tratamento na superfície de fragmentos radiculares, que foram submetidos à implantação no tecido subcutâneo de ratos, avaliando-se a reação tecidual presente, bem como buscou-se verificar, pela microscopia eletrônica de varredura, a topografia das superfícies submetidas a esse tratamento.

6.1 Sobre a metodologia empregada

A implantação de fragmentos radiculares no tecido subcutâneo de ratos foi muito utilizada para o estudo de eventos diversos do processo da doença periodontal ^{66, 78}.

A obtenção e o preparo dos fragmentos radiculares utilizados neste trabalho foram semelhantes ao método proposto por POLSON; LADENHEIM; HANES ⁷⁹, em 1986, e também ao método usado por OLIVEIRA ⁷⁰, em 1998. As dimensões dos fragmentos foram devidamente padronizadas (4x2x2mm), de modo semelhante aos trabalhos citados anteriormente ^{70,79}.

O método de armazenamento dos dentes usados no presente trabalho foi a imersão dos mesmos, logo após a extração, em frascos estéreis contendo soro fisiológico, mantidos em geladeira por no máximo 2 meses, após a extração. Este tipo de armazenamento foi usado em trabalhos como os de RUBO ⁹³ (1989) e OLIVEIRA ⁷⁰ (1998). Também preocupado com a minimização de fatores externos que pudessem interferir na resposta tecidual, como a contaminação, todos os procedimentos de manuseio dos dentes e confecção dos fragmentos radiculares foram realizados com o auxílio de instrumentais e luvas estéreis.

Com relação ao modelo de estudo empregado neste trabalho, atenta-se que os fragmentos ficaram totalmente implantados no tecido conjuntivo subcutâneo dos ratos, não existindo assim a concorrência existente entre este tecido e o tecido epitelial. Este último, por apresentar um *turn over* mais rápido do que o tecido conjuntivo, poderia interferir negativamente migrando e revestindo a superfície radicular e prejudicando a análise da relação com o tecido conjuntivo.

Sabe-se que a migração apical do epitélio juncional é uma das causas de fracasso das terapias regenerativas, pois impede a inserção de fibras conjuntivas na superfície radicular ⁷⁸.

Assim, este modelo, excluindo a participação epitelial, permitiu avaliar melhor a relação do tecido conjuntivo com a superfície dos fragmentos tratados por diferentes meios. Por outro lado, em situações periodontais reais, a proliferação epitelial pode em muito atrapalhar os resultados aqui verificados.

Pode-se ponderar ainda que esses animais apresentam alto metabolismo, com capacidade reparadora e regenerativa muito acelerada, o

que poderia diferir dos resultados encontrados em outros modelos. Portanto, não se pode extrapolar direta e integralmente esses resultados para humanos.

Entretanto, considera-se que a padronização do ambiente de avaliação da interface raiz e tecido subcutâneo de rato se faz necessária, para observar a capacidade de resposta inflamatória e imunológica, não permitindo recontaminação por novas bactérias e seus produtos, como ocorre na boca.

Os achados deste trabalho podem contribuir para o melhor conhecimento da reação tecidual frente a um tratamento recém proposto, que é o uso do laser em alta intensidade na terapia periodontal. Entretanto, sabe-se que estes achados não podem oferecer inferências diretas absolutas para o que poderia ocorrer no periodonto. Apesar disso, os parâmetros comparativos entre os diferentes tratamentos propostos podem conduzir a resultados esclarecedores em alguns aspectos.

Com relação aos tratamentos propostos, pode-se salientar que se buscou uma padronização dos procedimentos de raspagem e alisamento radicular, tendo como parâmetro o número de “golpes” realizados. Neste trabalho, foram realizados 20 golpes com curetas manuais novas e afiadas.

A quantificação do número de golpes foi baseada no trabalho de RUBO ⁹³, em 1989, que observou também, por meio da implantação de fragmentos radiculares em tecido subcutâneo de ratos, que 20 golpes com curetas manuais era a forma mais adequada para proporcionar um menor potencial inflamatório.

Evidentemente, em situações reais, a quantidade de golpes necessários à raspagem e alisamento radicular é muito variável, incluindo a

quantidade de placa e cálculo, destreza do operador, grau de afiação do instrumento, profundidade de bolsa, aspectos anatômicos, entre outros, sendo que a avaliação final da qualidade da superfície raspada é muito subjetiva ⁵⁵.

O tratamento químico radicular proposto foi realizado com protocolos já bem estabelecidos pela literatura, no que diz respeito ao tipo de substância e ao tempo de aplicação na raiz. Realizou-se a aplicação de ácido cítrico 50% com tetraciclina (pH=1,0), na forma de gel (Decalcific-Biotechnol, Bauru-SP) durante 3 minutos.

Os trabalhos de POLSON; HANES; LADENHENIM ^{38,79} avaliaram os efeitos do tratamento químico radicular com o uso de ácido cítrico associado à tetraciclina, também por 3 minutos, sendo os fragmentos radiculares tratados com ácido cítrico, implantados no tecido subcutâneo de ratos, com tempos de sacrifício de 1, 3, 5 e 10 dias.

Quanto ao uso do laser de Er:YAG, sabe-se que este ainda não possui protocolos bem definidos para o tratamento da superfície radicular, por ser uma modalidade de tratamento relativamente nova.

A possibilidade do emprego do laser de Er:YAG, assim como outros lasers de alta densidade de potência, na terapia periodontal, iniciou-se com os estudos de AOKI et al. ¹⁰, em 1994. A partir deste trabalho, outros autores com metodologias diversificadas passaram a estudar os efeitos destes lasers na superfície radicular. Nota-se que na maioria das pesquisas existentes nessa área foram empregados “in vitro”, sendo as análises realizadas em microscopia eletrônica de varredura.

O trabalho de AOKI et al. ¹⁰ (1994) consistiu da aplicação do laser de Er:YAG, visando a eliminação de cálculos em dentes humanos extraídos,

utilizando diferentes níveis de energia (de 10 a 120 mJ/pulso) e pulso de repetição de 10 pps. As alterações morfológicas e a eficiência do tratamento com laser foram observadas através de microscopia eletrônica de varredura. Observou-se nesse estudo que o nível de energia que promoveu melhores resultados foi 30 mJ/pulso e 10 pps, com irrigação.

Nota-se uma certa dificuldade comparativa entre os trabalhos existentes na literatura, pois cada um utiliza parâmetros diferentes. Por outro lado, a diversidade de protocolos empregados permitiu observar que algumas variáveis são essenciais para o resultado final da irradiação com laser. O tempo de aplicação, os níveis de energia utilizados, a frequência, a inclinação da ponta de trabalho e o uso de irrigação são fatores que devem ser cuidadosamente considerados para que não sejam obtidos resultados incompatíveis com a biologia tecidual, causando efeitos deletérios.

O presente trabalho buscou parâmetros que possibilitassem os melhores resultados já encontrados na literatura, com relação à utilização do laser de Er:YAG na superfície radicular.

Quanto aos níveis de energia utilizados, preconizou-se 60 mJ e 100 mJ. Um fator que deve ser discutido é a perda de energia sofrida durante a passagem do laser pela ponta de quartzo. Segundo o fabricante do laser utilizado neste estudo (Kavo Key-Laser), a perda de energia é da ordem de 57%, ou seja, na realidade os valores acima chegam na superfície radicular com 34mJ e 57mJ respectivamente. Portanto, sempre deve-se levar em consideração se os valores utilizados nos trabalhos são os valores do *display* do aparelho de laser ou se já foram descontadas as perdas de energia conhecidas.

Quanto à angulação da ponta de trabalho, deve-se considerar que os trabalhos que a utilizaram de forma perpendicular à superfície radicular, como FUJII et al.³², em 1998, não obtiveram bons resultados, além de não condizer com uma angulação adequada para utilização no âmbito clínico.

O trabalho de FOLWACZNY et al.³⁰ de 2001, mostrou os efeitos da aplicação do laser de Er:YAG em diferentes angulações. Observaram que a angulação influencia a quantidade de tecido radicular removido com o laser de Er:YAG e sugeriram uma angulação de trabalho de 30 graus com a superfície radicular.

O estudo clínico de SCHWARZ et al.⁹⁶, também de 2001, mostra que a angulação da ponta com a superfície radicular usada foi de 20 graus.

TANNOUS¹⁰⁶, em 2001, avaliou morfologicamente, pela microscopia eletrônica de varredura, as diferenças de interação laser-tecido em função das variações nos ângulos de aplicação do feixe de laser. Utilizou ângulos de 30, 45 e 90 graus e concluiu que as diferentes angulações interferem no efeito morfológico desejado sendo que, quanto menores as angulações, menores foram os efeitos causados.

Optou-se, no presente trabalho, por utilizar a angulação de 45 graus com a superfície radicular, por ser esta uma posição de fácil reprodução e por condizer de maneira mais próxima com o que se pode reproduzir clinicamente.

Em relação ao tempo de aplicação, optou-se pelo uso de 15 segundos, e em forma de varredura, assim como no trabalho de THEODORO¹⁰⁹ em 2001, que obteve bons resultados.

A ponta de quartzo foi, portanto, posicionada em contato com a superfície radicular num ângulo de 45 graus, realizando-se um movimento de varredura da superfície, durante 15 segundos.

Quanto às formas de análises adotadas pelo presente trabalho, procurou-se estabelecer uma relação entre os achados da microscopia óptica e da microscopia eletrônica de varredura, de forma complementar, para esclarecer as dúvidas existentes com relação aos efeitos causados pelo laser de Er:YAG, na superfície radicular.

6.2 Sobre os resultados obtidos

Na análise histológica realizada verificou-se a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, observando-se o grau de organização do mesmo para os diferentes grupos de tratamento, em diferentes períodos de reparo.

Observou-se pela análise histológica descritiva, em microscopia óptica, que aos sete dias de reparo houve melhores resultados nos grupos 1,2 e 3, sendo que apenas no grupo 3, onde se realizou o tratamento com o ácido cítrico com tetraciclina, pode-se notar uma orientação mais bem definida das fibras recém formadas em relação à superfície radicular dos fragmentos, havendo formação de fibras perpendiculares ou oblíquas aderidas à superfície. Observou-se também a presença de fibroblastos próximos à superfície radicular. Os grupos 1 e 2, neste período, ainda não exibiram orientação definida das fibras recém formadas. O grupo 4 mostrou orientação paralela das fibras conjuntivas em relação à superfície do

fragmento radicular, denotando uma resposta menos favorável quando comparado aos demais grupos, no mesmo período de reparo.

Os trabalhos de POLSON; HANES^{77,78,81} mostraram que os efeitos do tratamento com ácido podem propiciar superfícies radiculares mais receptivas para os fibroblastos, que produzirão as fibras e assim irão compor um novo tecido.

O trabalho de OLIVEIRA⁷⁰ também mostrou resultados favoráveis do uso do ácido cítrico, associado ou não com o fator de crescimento (PDGF), apenas em relação ao tratamento de raspagem e alisamento radicular.

Observou-se, no presente trabalho, que aos sete dias de reparo não foram encontradas diferenças estatísticas significantes quanto à densidade de fibroblastos, células inflamatórias e vasos, nos diferentes grupos de tratamento, confirmando os achados de OLIVEIRA⁷⁰, em 1998, que comparou diferentes tratamentos, incluindo a raspagem e alisamento radicular, ácido cítrico e PDGF, também em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.

Com relação ao número de células inflamatórias, notou-se que houve diferença significativa no período de sete dias para o grupo 4 (tratado apenas com raspagem e alisamento radicular), que obteve maior número de células inflamatórias comparado aos demais grupos (1,2 e 3) .

O menor número de células inflamatórias no grupo 3 (ácido cítrico com tetraciclina) comparado ao grupo 4 (raspagem e alisamento radicular) pode estar relacionado ao efeito de descontaminação que o ácido cítrico promove, reforçando alguns achados da literatura^{23,26,54,79}.

Da mesma forma, o efeito de descontaminação das superfícies dos fragmentos tratados com laser de Er:YAG promovidos pela ablação (grupos

1 e 2) pode justificar a diferença significativa no número de células inflamatórias encontradas nesse período de reparo, que foi significativamente menor do que no grupo 4, onde foram realizados apenas a raspagem e o alisamento radicular. Não houve diferença significativa no número de células inflamatórias entre os grupos 1, 2 e 3.

No trabalho de ANDO et al.⁷, em 1996, foi examinado “in vitro” o efeito bactericida do laser de Er:YAG nas bactérias periodontopatogênicas. As taxas de sobrevivência das bactérias viáveis nas colônias de *Porphyromonas gingivalis* irradiadas com o laser diminuíram significativamente. Esses achados mostraram que o laser de Er:YAG tem potencial bactericida.

YAMAGUSHI et al.¹¹⁴, em 1997, avaliaram os efeitos da irradiação do laser de Er:YAG nas superfícies radiculares e observaram a capacidade de remoção dos lipopolissacarídeos (LPS). O laser de Er:YAG removeu 83,1% dos LPS. Este estudo sugere que o laser de Er:YAG pode ser útil para o condicionamento radicular, promovendo a descontaminação superficial. Deve ser ressaltado que o laser pode agir descontaminando a superfície radicular pelo próprio poder de ablação que promove, eliminando o cimento contaminado.

No período de 14 dias de reparo, observou-se que nos grupos 1, 2 e 3 houve um contato íntimo entre as fibras recém formadas e as superfícies radiculares tratadas, com presença de fibras colágenas dispostas numa orientação perpendicular e/ou oblíqua às superfícies radiculares dos fragmentos, observando-se áreas de adesão. Outra característica foi a presença de células, como fibroblastos, em contato com áreas das superfícies dos fragmentos radiculares desses grupos.

Entretanto, no grupo 4, tratado apenas pela raspagem e alisamento radicular, esta relação de contato com a superfície não foi observada. Notou-se que as fibras adotaram um posicionamento paralelo às superfícies dos fragmentos, não havendo contato com a mesma, devido à característica de fibrosamento tecidual característico de encapsulamento. Estes achados são semelhantes aos encontrados por OLIVEIRA ⁷⁰, que notou que o grupo tratado apenas com raspagem e alisamento radicular, num período de reparo de 15 dias, não proporcionou adesão de fibras ao fragmento, entretanto não mostrou a característica nítida de encapsulamento.

O trabalho de HANES; POLSON; LADENHENIM ³⁸ (1985) demonstrou que a adesão de fibras às superfícies radiculares não contaminadas, com remoção do cimento, implantados no tecido subcutâneo de rato, foi conseguida nos grupos tratados com ácido cítrico, enquanto os fragmentos não tratados com ácido foram esfoliados. Com metodologia semelhante, seja em fragmentos de raízes não contaminadas com manutenção do cimento ³⁶ ou em fragmentos contaminados oriundos de dentes comprometidos por doença periodontal em que o cimento foi removido ⁷⁹, foram observados os mesmos resultados. Entretanto, POLSON; HANES, ⁷⁷ em 1989, não verificaram inserção de fibras em dentes contaminados, em que foram removidos os cálculos e mantido o cimento. Isso ocorreu porque o cimento contaminado não fora removido.

O presente estudo não se preocupou em padronizar quanto ao fato da superfície radicular estar ou não coberta por cimento. Apenas foram aplicados os tratamentos indicados, objetivando reproduzir o que ocorre no âmbito clínico. Os níveis de contaminação das superfícies radiculares foram verificados pelo grau de inflamação que o tecido mole circunjacente

apresentou, bem como na orientação e ocorrência de adesão das fibras conjuntivas.

Acredita-se que tanto o tratamento mecânico seguido da aplicação com ácido cítrico (grupo3) bem como os grupos tratados com laser (grupos 1 e 2), tenham exercido a descontaminação da superfície dos fragmentos, favorecendo a proliferação dos fibroblastos e adesão das fibras.

Neste sentido, FEIST ²⁷, em 2002, verificou em cultura de células a adesão e a proliferação de fibroblastos de gengiva humana sobre superfícies radiculares tratadas com laser de Er:YAG com 35 mJ/pulso e 59 mJ/pulso, sendo duas aplicações de 10 segundos e tratamento com cureta manual. Concluiu que as superfícies tratadas com laser de Er:YAG (35 mJ/pulso) favoreceram a adesão e a proliferação de fibroblastos, sendo o número de células e a velocidade da proliferação maiores do que em superfícies tratadas com alisamento radicular ou laser de Er:YAG (59 mJ/pulso). Estes resultados reforçam a possibilidade do uso do laser de Er:YAG, como método adjunto aos tratamentos convencionais, embora seja necessário o estabelecimento de forma precisa de protocolos de aplicação.

Assim como no período de 7 dias, observou-se que aos 14 e 28 dias de reparo não foram encontradas diferenças estatísticas significantes quanto à densidade de fibroblastos, células inflamatórias e vasos, nos diferentes grupos experimentais. O número de células também não apresentou diferenças significantes para este período.

No período de 28 dias notou-se que nos grupos de tratamento (1, 2 e 3) ainda houve a adesão de fibras com um posicionamento favorável à inserção, mantendo a orientação oblíqua e/ou perpendicular às superfícies dos fragmentos radiculares.

No grupo 4, o padrão de encapsulamento fibroso foi bastante característico, com a presença de inúmeros fibroblastos justapostos e delgados, numa orientação paralela à superfície radicular e sem qualquer adesão. Estes resultados também foram encontrados no trabalho de RUBO, em 1989, utilizando metodologia semelhante de implantação de fragmentos radiculares em tecido subcutâneo de rato, obtendo-se uma característica de encapsulamento fibroso para o grupo tratado com 20 golpes de cureta manual, no período de 30 dias de reparo.

Quanto às diferenças significantes da densidade de células e vasos e do número de células observados entre os períodos de reparo, dentro de um mesmo grupo de tratamento, pode-se considerar que todos esses achados encontram-se dentro dos padrões normais da evolução do processo de reparo, como o aumento do número de fibroblastos, diminuição do número de células inflamatórias assim como diminuição da densidade de vasos, conforme se processa a maturação tecidual.

A maioria dos trabalhos existentes na literatura específica realizaram análises morfológicas e topográficas das superfícies radiculares tratadas com o laser de Er:YAG, pela microscopia eletrônica de varredura 9,10,29,30,31,32,35,47,60,84,106,109.

Nesse sentido, no presente trabalho também houve preocupação, em avaliar as características morfológicas após o tratamento com o laser de Er:YAG, comparado aos demais tratamentos propostos.

Com relação à análise em microscopia eletrônica de varredura, observou-se que tanto no grupo 1 quanto no grupo 2 a superfície radicular apresentou-se com aspecto irregular e rugoso característico do processo de ablação exercido pelo laser de Er:YAG. Não foram observados sinais de

carbonização, fendas ou trincas, entretanto pequenas crateras foram notadas com aspecto de camadas sobrepostas em forma de escamas. É impossível afirmar com precisão se toda *smear layer* foi removida, pois a característica rugosa das superfícies não possibilitou realizar tal afirmação.

Assim como neste trabalho, HAFFNER ³⁵, em 1997, observou que a superfície irradiada com laser de Er:YAG se mostrou irregular e rugosa e que a média de ablação em dentes sem cálculo variou de $35\mu\text{m} \pm 13,5\mu\text{m}$ (60 mJ/4Hz) a $380\mu\text{m} \pm 45,8\mu\text{m}$ (200 mJ/10Hz). Notou ainda que quando havia presença de cálculo, ocorreu maior remoção de substância dentária, cuja média variou de $42\mu\text{m} \pm 9\mu\text{m}$ a $540\mu\text{m} \pm 80,4\mu\text{m}$, respectivamente. Ressalta-se que o autor utilizou angulação de 30 graus entre a ponta de trabalho e a superfície radicular.

Embora não tenha sido proposto no presente estudo, dimensionar o tamanho das depressões provocadas nas superfícies dos fragmentos, sabe-se que quanto maiores forem os níveis de energia usados, maiores serão os danos causados. Outros fatores a serem considerados neste aspecto são o tempo da irradiação, a frequência utilizada, a angulação da ponta de trabalho em relação a superfície a ser irradiada, além do uso de irrigação.

ISRAEL et al. ⁴⁷, em 1997, compararam as alterações morfológicas das superfícies radiculares tratadas com laser de Er: YAG usando irrigação com água para o resfriamento da superfície e os lasers de CO₂ e Nd:YAG, ambos com e sem o resfriamento de superfície. Os lasers de CO₂ e Nd:YAG induziram alterações superficiais incluindo cavitação, áreas de fusão e ressolidificação mineral e produção de carbonização superficial. Em contraste, o laser de Er:YAG produziu alterações na superfície radicular que

podem ser esperadas quando do condicionamento ácido, como a remoção de *smear layer* e exposição de matriz colágena.

RECHMANN et al.⁸⁴, em 1997, observaram que a aplicação do laser de Er:YAG provocou a remoção do cálculo sem o controle da ablação dos tecidos subjacentes, resultando numa superfície rugosa.

FUJII et al.³², em 1998, avaliaram os efeitos da irradiação do laser de Er:YAG no cimento radicular com diferentes níveis de energia, de 25 a 100 mJ/pulso/s, sob irrigação com água, com a ponta de trabalho perpendicular e em contato com a superfície radicular. Observações em MEV mostraram uma camada de dano tecidual de 15 µm no cimento irradiado e o tecido apresentou-se com uma aparência amorfa. Estas observações indicaram que o cimento pode ser lesado pela irradiação com o laser de Er:YAG. Entretanto, deve-se ressaltar que neste último trabalho utilizou-se o posicionamento da ponta perpendicular à superfície radicular. Sabe-se, como já citado anteriormente, de acordo com os trabalhos de FOLWACZNY et al.³⁰ 2001 e TANNOUS¹⁰⁶, 2001, que a angulação da ponta de trabalho tem influência na quantidade de substância radicular removida com o laser de Er:YAG.

O trabalho de FOLWACZNY et al.²⁹, em 2000, também demonstrou os efeitos da aplicação do laser de Er:YAG pela MEV. As superfícies radiculares tratadas com laser não revelaram sinais de danos térmicos, fusão ou fratura.

Com relação aos tratamentos convencionais, pode-se observar que no grupo 3 tratado com ácido cítrico 50%, com tetraciclina gel, durante 3 minutos, as características morfológicas superficiais apresentaram-se com

aspecto bastante regular e uniforme, sem a presença de *smear layer*, e exposição dos túbulos dentinários que estavam totalmente abertos e limpos.

Já o grupo 4, tratado somente com a raspagem e alisamento radicular com curetas, apresentou alterações morfológicas como ranhuras e marcações deixadas pela lâmina da cureta, além de remanescentes de *smear layer*.

Estes achados estão em concordância com o trabalho de BASTOS NETO ¹⁷, 2002, que analisou em microscopia eletrônica de varredura superfícies radiculares de dentes humanos hígidos e acometidos pela doença periodontal antes e após os tratamentos de raspagem e alisamento radicular e condicionamento com ácido cítrico e EDTA. Notou-se a presença de *smear layer* remanescente no grupo tratado com raspagem e alisamento radicular, assim como a presença de estrias e ranhuras deixadas pela instrumentação com curetas. O grupo tratado com ácido cítrico removeu toda a *smear layer*, promovendo áreas com túbulos dentinários abertos.

Outro trabalho que mostrou semelhança dos resultados encontrados foi o de THEODORO ¹⁰⁹, em 2001, que comparou pela microscopia eletrônica de varredura a efetividade da ação do ácido cítrico, EDTA, ácido cítrico associado ao cloridrato de tetraciclina e laser de Er:YAG na remoção de *smear layer* de superfícies radiculares após o tratamento de raspagem e alisamento radicular. Observou-se que o procedimento de raspagem e alisamento radicular com curetas manuais deixaram intensa camada de *smear layer* presente. Já os outros diferentes tratamentos propostos mostraram-se efetivos na remoção da *smear layer*. O tratamento com o laser de Er:YAG mostrou ausência de fraturas, trincas, fendas ou sinais de

carbonização. As irregularidades características da aplicação com laser de Er:YAG também estavam presentes.

Uma observação interessante no atual estudo é o fato das superfícies tratadas com o laser de Er:YAG apresentarem uma quantidade reduzida de trincas, quando comparados aos demais grupos de tratamento. Sabe-se que as trincas são promovidas pela desidratação que é realizada durante o processamento para análise no microscópio eletrônico de varredura. Talvez o laser de Er:YAG, durante o processo de ablação, possa tornar as superfícies mais resistentes, razão pela qual se explicaria o menor número de trincas encontradas.

A partir das considerações feitas sobre os achados deste trabalho e da literatura especializada, pode-se considerar que o tratamento com laser de Er:YAG poderá ser utilizado com eficiência no tratamento radicular periodontal, visando a descontaminação da superfície radicular, bem como eliminação de depósitos calcificados, desde que se atente aos parâmetros utilizados. Notou-se que o uso do laser de Er:YAG, assim como o uso do ácido cítrico com tetraciclina, promoveram um tratamento biologicamente mais aceitável do que o tratamento com raspagem e alisamento radicular, dentro dos parâmetros analisados neste trabalho.

As irregularidades promovidas pelo laser de Er:YAG na superfície radicular podem favorecer a adesão de fibroblastos, como já confirmado por FEIST ²⁷, em 2002, podendo vir a ser um importante método alternativo que facilitaria a formação de uma inserção de fibras, impedindo a migração apical do epitélio juncional.

Um fator de importância a ser considerado neste tipo de tratamento é a relação custo-benefício. Não se justifica a utilização de um laser como o de Er:YAG apenas para uma única especialidade. O alto custo do aparelho ainda é um fator limitante que deve ser considerado.

Entretanto, sua característica de atuação multidisciplinar é o ponto chave para o desenvolvimento de centros integrados que possam atuar amplamente, minimizando este problema.

CONCLUSÕES *

7 CONCLUSÕES

- Os grupos tratados com laser de Er:YAG (grupos 1 e 2) exibiram, pela análise em microscopia óptica, resultados semelhantes ao grupo onde aplicou-se ácido cítrico com tetraciclina (grupo 3), oferecendo assim vantagens terapêuticas em relação apenas a raspagem e alisamento radicular.
- O grupo tratado apenas com raspagem e alisamento radicular com cureta (grupo 4), em microscopia óptica, apresentou maior número de células inflamatórias comparado aos demais grupos de tratamento, no período de 7 dias de reparo, indicando que a utilização de métodos alternativos, como o uso de substâncias ácidas ou até mesmo o laser de Er:YAG, podem viabilizar a descontaminação das superfícies radiculares.
- Algumas áreas mostraram fibras colágenas aderidas às superfícies radiculares dos fragmentos tratados pelos grupos 1, 2 e 3, indicando a biocompatibilidade dos fragmentos radiculares desses grupos em relação ao tecido conjuntivo do subcutâneo do rato, diferentemente do grupo 4, que demonstrou característica de encapsulamento fibroso.
- A análise em microscopia eletrônica de varredura permitiu observar que os grupos tratados com laser de Er:YAG (grupos 1 e 2) apresentam superfície rugosa com a presença de pequenas crateras características do processo de ablação. Essas irregularidades, desde que melhor

controladas por protocolos de utilização bem definidos, podem favorecer a adesão da fibrina nos estágios iniciais da cicatrização, podendo facilitar a formação de fibras inseridas nessas superfícies.

- O estudo de protocolos de utilização do laser de Er:YAG é fundamental para o desenvolvimento de técnicas seguras que possam viabilizar trabalhos clínicos.
- Os protocolos utilizados neste trabalho demonstraram resultados favoráveis, tanto à resposta do tecido subcutâneo de ratos, quanto à análise em microscopia eletrônica de varredura, podendo-se afirmar, dentro dos parâmetros estudados, que o laser de Er:YAG pode representar uma alternativa na terapia radicular periodontal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADELSON, L.J. et al. In vitro citotoxicity of periodontally diseased root surfaces. **J. Periodont.**, v.51, n.12, p.700-4, Dec. 1980.
2. ADRIAENS, P.A., et al. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. **J. Periodont.**, v.59, n.4, p.222-30, Apr. 1988.
3. ADRIAENS, P.A., et al. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. **J. Periodont.**, v.59, n.8, p. 493-503, Aug.1988.
4. ALEO, J.J. et al. The presence and biologic activity of cementum- bound endotoxin. **J. Periodont.**, v.45, n.9, p.672-75, Sept. 1974.
5. ALEO, J.J.; DE RENZIS, F.A.; FARBER, P.A. In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. **J. Periodont.**, v.46, n.11, p.639-45, Nov. 1975.
6. ALVARES, E.P. **Observações morfológicas e radioautográficas sobre citodiferenciação e proliferação celular na glândula submandibular de rato.** São Paulo, 1972. 123p. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
7. ANDO, Y. et al. Bactericidal effect of Erbium:YAG laser on periodontopathic bacteria. **Lasers Surg. Med.**, v.19, n. 2, p. 190-200, 1996.
8. AOKI, A. et al. Comparison between Er:YAG laser and conventional technique for root caries treatment in vitro. **J. dent. Res.**, v.77, p.1404-14, 1998.
9. AOKI, A. et al. In vitro studies of Er:YAG laser scaling of subgingival calculus in comparison with ultrasonic scaling. **J. Periodont. Res.**, v.35, n.5, p. 266-277, 2000.
10. AOKI, A. et al. In vitro studies on laser scaling of subgingival calculus with na Erbium: YAG laser. **J. Periodont.**, v.65, n.12, p. 1097-106, 1994.
11. ARMITAGE, C.G.; CHRISTIE, T.M. Structural changes in exposed human cementum. Light microscopic observations. **J. Periodont. Res.**, v.8, n.6, p.343-55, Nov. 1973.
12. ARMITAGE, C.G.; CHRISTIE, T.M. Structural changes in exposed human cementum. Electron microscopic observations. **J. Periodont. Res.**, v.8, p.356-65, 1973.
13. BADER, H.I. Use of lasers in periodontics. **Dent. Clin. N. Amer.**, v.44, n. 4, Oct., p.779-91, 2000.

14. BAKER, P.J. et al. An in vitro screening model to evaluate root conditioning protocols for periodontal regenerative procedures. **J. Periodont.**, v.71, n.7, p.1139-43, July 2000.
15. BARNES, F.S. Applications of lasers to biology and medicine. **Proc. IEEE**, v.63, p.1269-1277, 1975.
16. BASS, C.C. A previously undescribed demonstrable pathologic condition in exposed cementum and the underlying dentine. **Oral Surg.**, v.4, p.641-51, 1951.
17. BASTOS NETO, F.V.R. **Análise em microscopia eletrônica de varredura de superfícies radiculares antes e após raspagem e condicionamento com ácido cítrico e EDTA.** Bauru, 2002. 102p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
18. BLOMLOF, L. et al. New attachment in monkeys with experimental periodontitis with and without removal of the cementum. **J. clin. Periodont.**, v.14, n.3, p.136-43, Mar. 1987.
19. BOYKO, G.A.; BRUNETTE, D.M.; MELCHER, A.H. Cell attachment to demineralized root surfaces in vitro. **J. Periodont. Res.**, v.15, n.3, p.297-303, May 1980.
20. BRUGNERA, A.; VILLA, R.G.; GENOVESE, W.J. **Laser na odontologia.** São Paulo, Pancast, 61p. 1991.
21. CATON, J.G.; ZANDER, H.A. The attachment between tooth and gingival tissues after periodic root planing and soft tissue curettage. **J. Periodont.**, v.50, n.9, p.462-6, Sept. 1979.
22. CECCHINI, S.C.M. **Estudo in vitro das aplicações do laser de Hólmio:YLF em esmalte e dentina, visando a realização de cirurgia de acesso endodôntico e preparo cavitário.** São Paulo, 1995. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo.
23. CHAVES, E. et al. The effect of citric acid application on periodontally involved root surfaces. An in vitro scanning electron microscopic study. **Int. J. Periodont. Restorat. Dent.**, v.13, n.2, p.188-196, 1993.
24. COLE, R.T. Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth. A histological study. **J. Periodont. Res.**, v.15, n.1, p.1-9, Jan. 1980.
25. COZEAN, C. et al. Dentistry for the 21st century? Erbium:YAG laser for teeth. **J. Amer. dent. Ass.**, v.128, p. 1080-87, 1997.

-
26. DALY, C.G. Antibacterial effect of citric acid treatment of periodontally diseased root surfaces. In vitro. **J. clin. Periodont.**, v.9, n.5, p.386-92, May 1982.
27. FEIST, I.S. **Adesão e proliferação de fibroblastos de gengiva humana cultivados sobre superfícies radiculares tratadas com laser de Er:YAG.** São Paulo, 2002. 73p. Tese (Doutorado)- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
28. FINE, D.H. et al. Preliminary characterization of material eluted from the roots of periodontally diseased teeth. **J. Periodont. Res.**, v.15, n.1, p.10-9, Jan. 1980.
29. FOLWACZNY, M. et al. Root substance removal with Er:YAG laser radiation at different parameters using a new delivery system. **J. Periodont.**, v.71, n.2, p.174-55, Feb. 2000.
30. FOLWACZNY, M. et al. The effect of working tip angulation on root substance removal using Er:YAG laser radiation: an in vitro study. **J. clin. Periodont.**, v.28, n.3, p.220-6, Mar. 2001.
31. FRENTZEN, M.; BRAUN, A.; ANIOL, D. Er:YAG laser scaling of diseased root surfaces. **J. Periodont.**, v.73, n.5, p.524-30, May 2002.
32. FUJII, T. et al. Scanning electron microscopic study of the effects of Er:YAG laser on root cementum. **J. Periodont.**, v.69, n.11, p.1283-90, Nov. 1998.
33. GARRET, J.S. et al. Effects of citric acid on diseased root surfaces. **J. Periodont. Res.**, v.13, p.155-63, 1978.
34. GOLDMAN, L. et al. Laser radiation of malignancy in man. **Cancer (Philad.)**, v.18, n. 5, p.533-45, 1965.
35. HAFFNER, C. et al. The use of 2,94µm Er:YAG laser in periodontal treatment. **European Federation of Periodontology**, 1997. Florenza, Italy. (abstract)
36. HANES, P.J.; POLSON, A.M. Cell and fiber attachment to demineralized cementum from normal root surfaces. **J. Periodont.**, v.60, n. 4, p.188-98, Apr. 1989.
37. HANES, P.J.; POLSON, A.M.; FREDERICK, T. Citric acid treatment of periodontitis- affected cementum. A scanning electron microscopic study. **J. clin. Periodont.**, v.18, p.567-75, 1991.
38. HANES, P.J.; POLSON, A.M.; LADENHEIM, S. Cell and fiber attachment to demineralized dentin from normal root surfaces. **J. Periodont.**, v.56, n. 12, p. 752-65, Dec. 1985.

39. HANES, P.J.; O'BRIEN, N.J.; GARNICK, J.J. A morfological comparison of radicular dentin following root planing and treatment with citric acid or tetracycline HCl. **J. clin. Periodont.**, v.18, n.9, p.660-8, Oct. 1991.
40. HATFIELD, D.G.; BAUMHAMMERS, A. Citotoxic effects of periodontally involved surfaces of human teeth. **Arch. oral Biol.**, v.16, p.465-68, Apr. 1971.
41. HAWKINS, C.; STERRETT, J.D.; RUSSEL, C. Citric acid demineralization of cementum and dentin: the effect of the storage medium. **J. clin. Periodont.**, v.24, n.4, p.264-71, Apr. 1997.
42. 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.**, v.9, n.4, p.338-44, 1989.
43. HIBST, R.; KELLER, U. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: II. Light microscopic and SEM investigation. **Lasers Surg. Med.**, v.9, n.4, p.345-51, 1989.
44. HIGASHI, T.; OKAMOTO, H. The effect of ultrasonic irrigation before and after citric acid treatment on collagen fibril exposure: An in vitro SEM study. **J. Periodont.**, v.66, n.10, p.887-91, Oct. 1995.
45. HUGHES, F.J.; SMALES, F.C. Immunohistochemical investigation of the presence and distribution of cementum associated lipopolysaccharides in periodontal disease. **J. Periodont. Res.**, v.21, n.2, p.660-7, Mar. 1986.
46. HUGHES, F.J. et al. Investigation of the distribution of cementum-associated lipopolysaccharides in periodontal disease by scanning electron microscope immunohistochemistry. **J. Periodont. Res.**, v.23, p.100-6, 1988.
47. ISRAEL, M. et al. The effects of CO₂, Nd:YAG and Er: YAG lasers with and without surface coolant on tooth root surfaces. **J. clin. Periodont.** v. 24, n. 9, p. 595-602, Sept. 1997.
48. JONES, W. A.; O'LEARY, T.J. The effectiveness of in vivo root planing in removing bacterial endotoxin from the roots of periodontally involved teeth. **J. Periodont.**, v.54, p.337-42, 1978.
49. KARP, W. et al. Fibronectin and laminin binding to demineralized tooth root surfaces. **J. Periodont. Res.**, v.21, n.1, p.30-8, Jan. 1986.
50. KELLER, U.; HIBST, R., Effects of Er:YAG laser in caries treatment: a clinical pilot study. **Lasers Surg. Med.**, v.20, p.32-38, 1997.

-
51. KELLER, U.; HIBST, R., Effects of erbium:YAG laser osteotomy. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY, 3. Salt Lake City, Aug. 6-8, 1992. **Proceedings**. s.l. International Society of Lasers in Dentistry. 1992, p. 239-40.
52. KUMAZAKI, M. Results of etching with Er:YAG laser. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY, 3. Salt Lake City, Aug. 6-8, 1992. **Proceedings**. s.l. International Society of Lasers in Dentistry. 1992, p.141-2.
53. LABAHN, R. et al. Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning. **J. Periodont.**, v.63, n.4, p.303-9, Apr. 1992.
54. LAFFERTY, T.A.; GHER, M.E.; GRAY, J.L. Comparative SEM on the effect of acid etching with tetracycline HCl or citric acid on instrumented periodontally involved human root surfaces. **J. Periodont.**, v.64, n.8, p.689-93, Aug. 1993.
55. LANDRY, C. et al. Comparison between a short and a conventional blade periodontal curet: a in vitro study. **J. clin. Periodont.**, v.26, n.8, p.548-51, Aug. 1999.
56. LOPEZ, N.J. et al. Inflammatory effects of periodontally diseased cementum studied by autogenous dental root implants in humans. **J. Periodont.**, v.51, n.10, p.582-93, Oct. 1980.
57. MAIMAN, T. H. Stimulated emission of radiation in rubi. **Nature**, 187, p.493-4, Aug., 1960.
58. MARQUES, J. L. L. **Avaliação dos efeitos da irradiação laser, utilizando Nd:YAG, CO₂ e Argônio no selamento dentinário e marginal de obturações retrógradas**. São Paulo, 1997. Tese (Livre-Docência). Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
59. MEHL, A. et al. Bactericidal Effects of 2.94 μ m Er :YAG-Laser Radiation in Dental Root Canals. **J. Endod.**, v. 25, n. 7, Jul., p.490-3, 1999.
60. MELLO, F.A.S. **Avaliação em microscopia eletrônica de varredura da superfície radicular, raspada e alisada com Er:YAG laser**. São Paulo, 2000. 81p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
61. MELLO, J.B. **Laser em odontologia**. 1 ed. São Paulo, Santos, 2001.
62. MISERENDINO, L.J.; PICK, R.M. **Lasers in Dentistry**. Quintessence, 341p. 1995.
63. MISRA, V. et al. Effects of a carbon dioxide Laser on periodontally involved root surfaces. **J. Periodont.** , v. 70, n. 9, p.1046-52, 1999.

-
64. MOORE, J. et al. The distribution of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in relation to periodontally involved root surfaces. **J. clin. Periodont.**, v.13, p.748-51, Jul. 1986.
65. MORONEY, **Facts from figures**. Penguin Books, Baltimore-Maryland, 1962 apud ALVARES, E.P. **Observações morfológicas e radioautográficas sobre citodiferenciação e proliferação celular na glândula submandibular de rato**. São Paulo, 1972. 123p. Tese (Doutorado)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
66. MORRIS, M.L. The subcutaneous implantation of periodontally diseased roots. **J. Periodont.**, v.43, n.12, p.737-47, Dec. 1972.
67. NAKIB, N.M. et al. Endotoxin penetration into root cementum of periodontally healthy and diseased human teeth. **J. Periodont.**, v.53, n.6, p.368-78, Jun. 1982.
68. NYMAN, S. et al. Healing following reimplantation of teeth subjected to root planning and citric acid treatment. **J. Periodont.**, v.12, n.4, p.294-305, Apr. 1985.
69. O'LEARY, T.J. The impact of research on scaling and root planing. **J. Periodont.**, v.57, n.2, p.69-75, Feb. 1986.
70. OLIVEIRA, M.D.B. **Tratamento radicular com PDGF-BB: Uma análise comparativa com o tratamento mecânico e com o condicionamento ácido, em fragmentos dentários implantados no subcutâneo de ratos**. Bauru, 1998. 119p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
71. PARDINI, L.C. **Estudo morfométrico da glândula submandibular do camundongo. Comparação entre sexos**. Bauru, 1985. 146p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
72. PATEL, C.K.N. Continuous-wave laser action on vibrational-rotational transitions of CO₂. **Phys. Rev.**, v.136, p.1187-93, 1964.
73. PICK, R.M.; COLVARD, M.D. Current Status of lasers in soft tissue dental surgery. **J. Periodont.**, v.64, p.589-602, 1993.
74. PINHEIRO, A. L. B. Normas de segurança quando da utilização de laser. **Rev. gaúcha Odont.**, v.43, n.4, p. 227-232, jul/ago, 1995.
75. POLSON, A.M. et al. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. **J. Periodont.**, v.55, p. 443-46, 1984.

-
76. POLSON, A.M.; CATON, J. Factors influencing periodontal repair and regeneration. **J. Periodont.**, v.53, n.10, p.617-25, Oct. 1982.
77. POLSON, A.M.; HANES, P.J. Cell and fiber responses to cementum from periodontitis affected root surfaces after citric acid treatment. **J. clin. Periodont.**, v.16, n.8, p.489-97, Sept. 1989.
78. POLSON, A.M.; HANES, P.J. The root surface and periodontal regeneration. In: POLSON, A.M. **Periodontal regeneration: current status and concepts**. Chicago, Quintessence, 1994. p.41-52.
79. POLSON, A.M.; LADENHEIM, S.; HANES, P.J. Cell and fiber attachment to demineralized dentin from periodontitis affected root surfaces. **J. Periodont.**, v.57, n.4, p.235-46, Apr. 1986.
80. POLSON, A.M.; PROYE, M.P. Effect of root surface alterations on periodontal healing (II). Citric treatment of the denuded root. **J. clin. Periodont.**, v.9, n.6, p.441-54, June, 1982.
81. POLSON, A.M.; PROYE, M.P. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. **J. Periodont.**, v.54, n.3, p.141-47, 1983.
82. PROYE, M.P.; POLSON, A.M. Effect of root surface alterations on periodontal healing (I). Surgical denudation. **J. clin. Periodont.**, v.9, p.441-54, 1982.
83. RADVAR, et al. An evaluation of the Nd:YAG laser in periodontal pocket therapy. **Brit. dent. J.**, v. 180, n. 2, p. 57-62, 1996.
84. RECHMANN, P. et al. Light and scanning electron microscope investigations comparing calculus removal using an Er:YAG laser and frequency doubled alexandrite laser. **Proc. SPIE.**, v.2973, p.53-9, 1997.
85. RECHMANN, P.; GOLDIN, D.S.; HENNING, T. Er:YAG lasers in dentistry: na overview. **Proc. SPIE**, v.3248 p.2-13, 1998.
86. REGISTER, A.A. Bone and cementum induction by dentin, demineralized in situ. **J. Periodont.**, v.44, n.1, p.49-54, Jan. 1973.
87. REGISTER, A.A.; BURDICK, F.A. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. Optimum range. **J. Periodont.**, v.46, n.11, p.646-55, Nov. 1975.
88. RIRIE, C.M.; CRIGGER, M.; SELVIG, K.A. Healing of periodontal connective tissues following surgical wounding and application of citric acid in dogs. **J. Periodont. Res.**, v.15, n.3, p.314-27, May 1980.
89. ROBERTSON, C.W.; WILLIAMS, D. Lambert absorption coefficients of water in the infrared. **J. Opt. Soc. Am.**, v.61, p.1316-20, 1971.

-
- 90.ROMPEN, E.H.; GOFFINET,G.H.; NUSGENS,B. Human periodontal ligament fibroblast behavior on chemically conditioned dentine. An in vitro study. **J. Periodont.**, v.70, n.10, p.1144-52, Oct. 1999.
- 91.ROSSMANN, J.A.; COBB, C.M. Lasers in Periodontal therapy. **Periodont** **2000**, v.9, p.150-64, 1995.
- 92.RUBEN, M.P. et al. Significance of root surface preparation in periodontal therapy. **Quintessence Int.**, v.9, n.57-8, 1978.
- 93.RUBO, M.L., **Avaliação do desgaste superficial provocado pela raspagem manual e ultra-sônica em raízes dentais humanas periodontalmente envolvidas e do potencial inflamatório destas sobre o tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.** Bauru, 1989. 164p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
- 94.RUSS, J.C.; DEHOFF, R.T. **Practical stereology**. 2 ed. Plenum press, New York, 2000.
- 95.SCHAWLOW, A . L.; TOWNES, C.H. Infrared and optical masers. **Phys. Rev.**, v.112, n.6, p.1940-49, Dec., 1958.
- 96.SCHWARZ, F. et al. Periodontal treatment with an Er:YAG laser compared to scaling and root planing. a controlled clinical study. **J. Periodont.**, v.72, n.3, p.361-7, 2001.
- 97.SELVIG, K.A. Ultrastructural changes in cementum and adjacent connective tissue in periodontal disease. **Acta odontol. scand.**, v.24, p.459-500, 1966.
- 98.SELVIG, K.A.; HALS, E. Periodontally diseased cementum studied by correlated microradiography, electron probe analysis and alectron microscopy. **J. Periodont. Res.**, v.12, n.6, p.419-29, Nov. 1977.
- 99.SNYDERMAN, R. Role for endotoxin and complement in periodontal tissue destruction. **J. dent. Res.**, v.51, p.356-61, 1972.
100. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Microbiologia da doença periodontal. In: LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, c1999. Cap. 4, p. 92-126.
101. SOTTOSANTI, J.S.; GARRET, J.S. A rationalle for root preparation a scanning electron microscopic study of diseased cementum. **J. Periodont.**, v.46, n.3, p.628-9, Mar. 1975.
102. STAHL, S. Repair potential of the soft tissue root interface. **J. Periodont.**, v.48, n.9, p.545-52, Sept. 1977.

103. STERN, R. H.; SOGNAES, R.F. Laser beam on dental hard tissues. In: INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR DENTAL RESEARCH. General Meeting, 42.Los Angeles, Mar. 19-22, 1964. **Abstracts of papers**. Chicago, **J. Dent. Res.**, v.43, n.5, p.879, 1964. [Abstract n.307]
104. TANAKA, K.; O'LEARY, T.; KAFRAWY, A. The effect of citric acid on retained plaque and calculus. **J. Periodont.**, v.60, p.81-3, 1989.
105. TANJI, E. Y. **Alterações morfológicas do esmalte e dentina de cavidades classe I preparadas com o laser de Érbio:YAG - Estudo in vitro**. São Paulo, 1998. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
106. TANNOUS, J.T. **Avaliação morfológica das superfícies do esmalte e do cimento dental após a irradiação do laser de Er:YAG em diferentes angulações**. São Paulo, 2001. 53p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
107. TERRANOVA,V.P.; MARTIN, G.R. Molecular factors determining gingival tissue interaction with tooth structure. **J. Periodont. Res.**, v.17, p.530-3, 1982.
108. THE RESEARCH, Science and Therapy Committee of The American Academy of Periodontology. Lasers in periodontics (position paper). **J. Periodont.**, v.67, p. 826-30, 1996.
109. THEODORO, L.H. **Estudo comparativo, através de microscopia eletrônica de varredura, da ação de diferentes substâncias químicas e do laser de Er:YAG, na remoção de smear layer, em superfícies radiculares submetidas à raspagem e aplainamento**. São Paulo, 2001. 77p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
110. WATANABE, H. et al. Clinical assessments of the erbium:YAG laser for soft tissue surgery and scaling. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.14, p. 67-75, 1996.
111. WEIBEL, E.R. **Stereological methods. Practical methods for biological morphometry** London, Academic Press, 1979.
112. WHITE, J. M.; GOODIS, H.E.; ROSE, C.L. Use of the pulsed Nd:YAG laser for intraoral soft tissue surgery. **Lasers Surg. Med.**, v.11, p. 455-61, 1991.
113. WIGDOR, H.A. et al. Lasers in dentistry. **Lasers Surg. Med.**, v.16, n.2, p.103-33, 1995.

114. YAMAGUSHI, H. et al. Effects of irradiation of na Erbium:YAG laser on root surfaces. **J. Periodont.**, v.68, n.12, Dec., p.1151-5, 1997.
115. ZECELL, D.M. **Curso Clínico de Laser em Odontologia**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo, 2001. Apostila de curso.

ABSTRACT*

COMPARATIVE EVALUATION BETWEEN PERIODONTAL RADICULAR THERAPIES, CONVENTIONAL AND ER:YAG LASER, FROM RAT CONNECTIVE TISSUE RESPONSE AND SUPERFICIAL TOPOGRAPHY, USING ROOT SPECIMENS FROM PERIODONTITIS- AFFECTED HUMAN TEETH.

ABSTRACT

The use of Er:YAG laser has been proposed as an alternative or adjunctive approach for radicular mechanical therapy. However, the influence of laser radiation on radicular surfaces is not absolutely clear yet. The aim of this study was to evaluate the alterations that occurred on radicular surfaces irradiated with Er:YAG laser, using the scanning electronic microscopy (SEM) evaluation, and the rat subcutaneous tissue response resulting from human dental root specimens implantation at 7, 14 and 28 days. The treatment groups were: group 1- Er:YAG laser with 60 mJ, 10 pps, for 15 s; group 2- Er:YAG laser with 100 mJ, 10 pps, for 15 s; group 3- root planning followed by surface demineralization with citric acid and tetracycline for 3 min; and group 4- root planning. The results of histologic and morphometric analysis showed a higher number of inflammatory cells in group 4, for a period of 7 days, compared with all the other groups. In groups 1, 2 and 3, some areas showed adherence of fibers in the favorable angulation to attachment, denoting more biocompatibility when compared with group 4. SEM analysis showed small craters due to the laser ablation process. Such irregularities can favour the fibrin adhesion in the initial stages of healing, thus facilitating the attachment of fibers in radicular surfaces. The protocols used in this study proved good results, showing that the use of Er:YAG laser may represent an alternative approach in periodontal radicular therapy.