**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

PAULA STEPHANIA BRANDÃO HAGE KARAM

**Influência de raízes tratadas quimicamente e com laser sobre a
proliferação de fibroblastos gengivais humanos e granulação óssea**

**BAURU
2013**

PAULA STEPHANIA BRANDÃO HAGE KARAM

**Influência de raízes tratadas quimicamente e com laser sobre a
proliferação de fibroblastos gengivais humanos e granulação óssea**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Reabilitação Oral com linha de pesquisa em Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Andreotti Damante

**BAURU
2013**

K143i Karam, Paula
Influência de raízes tratadas quimicamente e com laser sobre a proliferação de fibroblastos gengivais humanos e granulação óssea / Paula Stephania Brandão Hage Karam. – Bauru, 2013.
121p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Carla Andreotti Damante

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 086/2011
Data: 31/08/2011

PAULA STEPHANIA BRANDÃO HAGE KARAM

Nascimento	31 de outubro de 1986 Belém – PA
Filiação	José Antonio da Silva Hage Karam Maria Paula Inês Brandão Hage Karam
1º e 2º graus	Colégio Marista – Nossa Senhora de Nazaré – Belém – PA.
2005-2009	Graduação: Curso de Odontologia – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará – Belém – PA.
2009-2011	Especialização em Periodontia pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.
2010	Prática profissionalizante junto à disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
2010-2011	Curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia Oral Avançada – Odontologia Edgar Moraes – OPEM – Bauru – SP.
2011-2012	Curso de Prótese sobre implante – Clínica Via Oral – Bauru – SP.
2012-2012	Curso de Aperfeiçoamento em Implante – Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas – Bauru – SP.
2011-2013	Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração em Reabilitação Oral com linha de pesquisa em Periodontia. Bolsista CAPES.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação, primeiramente, a Deus e a Nossa Senhora. E aos meus avôs Raimundo Bento Belém Brandão e Emílio Hage Karam, à minha bisavó Dionízia Menezes Teixeira e à minha madrinha e eterna segunda mãe, Abedilza Jesus dos Santos, que estiveram todos esses anos do lado Deles, olhando por mim, guiando todos os meus passos e me enviando forças para continuar a realizar os meus objetivos.

Dedico também aos meus pais, José Antonio da Silva Hage Karam e Maria Paula Inês Hage Karam, que além de serem responsáveis por toda a minha educação, são também o meu exemplo de vida profissional e pessoal. Se consegui chegar até aqui foi “culpa” de vocês.

Enfim, dedico também ao meu irmão, José Antonio da Silva Hage Karam Filho, que mesmo distante e com todas as nossas diferenças, sempre me apoiou e incentivou nos meus objetivos. E sempre acreditou no meu sucesso.

Não poderia deixar de dedicar às minhas avós, Guiomar Teixeira Brandão e Maria Pinheiro Hage Karam, que desde que nasci, a primeira “menina”, me mimaram e me educaram quando necessário com pulso firme. E aos meus tios Luciano Afonso Teixeira Brandão e Josyanne Maués Brandão, juntamente com meus primos Pedro Afonso Maués Brandão e Bento Afonso Maués Brandão, que desde sempre e para sempre serão minha segunda família. Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus e a Nossa Senhora, que tem lugar soberano na minha vida. Por todos os momentos que me senti em dificuldade e que pedi que acalmasse meu coração e Eles atenderam às minhas preces. Obrigada por fazerem parte de tudo em mim!

Coisas inesperadas acontecem todos os dias. Você geralmente espera que tudo ocorra da forma mais tranquila ou exatamente como estava programado, mas o que acontece é o avesso disso. O desejo de continuar diminui e a vontade que fica é de desistir, mas são nesses momentos que verdadeiros Anjos se revelam nas nossas vidas. O caminho continua o mesmo, mas a direção é oposta... depois de tantos atropelos e confusões eu posso começar a agradecer a todos que de alguma forma influenciaram, apoiaram ou me ajudaram no decorrer desse mestrado.

Agradeço infinitamente aos meus pais, José e Paula, que são os verdadeiros responsáveis por tudo. Quando digo que tudo o que faço é para vocês é a mais pura verdade. Se eu estou aqui, terminando o mestrado, é para demonstrar que todo o esforço e a educação a mim conferida valeram a pena. Além dessa responsabilidade, vocês também se encarregaram de me ensinar de tudo um pouco sobre a vida e muito sobre o amor... para mim, se o amor existe, ele está materializado em vocês. Amo-os imensamente e para todo o sempre.

Agradeço também ao meu irmão, Karam, que contribuiu sempre com muita amizade para o meu desenvolvimento e engrandecimento. Você é muito mais responsável do que imagina por cada passo que eu dou. E eu te amo tanto, que só quero o teu bem.

À minha família, em especial, minhas avós Maria e Guiomar, meus avôs Emílio e Bento (in memoriam), meus tios Luciano e Josy e meus primos Pedro e Bento, que fizeram parte de toda a minha educação e formação. Vocês me inspiram e me ensinam o verdadeiro sentido da família. Amo vocês!

*Ao meu melhor amigo e namorado, **Rubens**. Conhecer você foi essencial nessa caminhada. Ter a sua companhia, carinho, amor, dedicação e amizade também me fizeram conseguir chegar até aqui. Todas as vezes que eu estava “caindo” você sempre me segurava e me levantava, me apoiando em todos os momentos. Acho que nunca te disse isso, mas eu te amo, pela pessoa que você hoje em dia significa para mim. Espero te ter sempre na minha vida.*

*A minha orientadora **Profa. Dra. Carla Andreotti Damante**. É difícil em poucas palavras conseguir agradecer TUDO o que você fez por mim. Agradeço imensamente pela confiança a mim depositada. Agradeço por ter sido sua primeira orientada de Mestrado e por todas as oportunidades que você me deu durante esses anos. Hoje em dia, sei que posso dizer com segurança que eu não tenho só uma orientadora, tenho uma amiga que vou levar por toda a vida. Agradeço por todos os momentos de descontração, que foram muitos, talvez pelo fato de sermos tão parecidas no jeito falante e alegre de ser.*

*Agradeço ao **Prof. Dr. Euloir**, **Prof. Dr. Sebastião**, **Profa. Dra. Adriana** e a **Profa. Dra. Malu**, professores da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru. Por todo o conhecimento de periodontia a mim passado durante a especialização, estágio e mestrado. Poucos sabem, mas cheguei aqui só gostando de periodontia e hoje em dia eu simplesmente amo.*

*Ao **Prof. Dr. Caio Figueiredo**, que eu conheci ainda como professor na especialização, mas que com o tempo foi se tornando um amigo e parceiro admirável. Agradeço por toda a confiança que você deposita em mim e pelos momentos de amizade.*

*Ao **Prof. Dr. Rodrigo de Oliveira** do departamento de Bioquímica da FOB. Pela possibilidade de participação no grupo de Cultura de Células e por estar sempre disponível para ajudar.*

Aos funcionários da disciplina de Periodontia da FOB: Ivânia, Edilaine e Marcão. Ivânia, meu primeiro contato dentro da FOB, você sabe que além de amiga, você é como uma mãe pra mim aqui em Bauru, obrigada por tudo mesmo. Edilaine agradeço por toda a amizade e pelos momentos de felicidade que dividimos nesses anos. Marcão agradeço por todas as risadas que demos durante os cafezinhos diários. Espero que vocês saibam que meus dias foram mais felizes sabendo que encontraria sempre vocês.

Agradeço a Denise – Alegria, por ter demonstrado ser uma grande amiga e companheira nas horas que mais precisei.

Ao meu amigo Rafael Ferreira. Amigo, irmão e anjo da guarda. Você é responsável por quase 100% dessa minha dissertação. Além de me ajudar em todos os passos da pesquisa, me ajudou dando apoio psicológico e amor. Não existe palavra para descrever você. Só te conhecendo para entender a magnitude da tua existência. Obrigada por você fazer parte da minha vida, do fundo do coração. Conte comigo para tudo!

A todos os meus colegas de mestrado: João, Alejandra, Adelfina, Emília e Fabíola. João, você foi um parceiro do início ao fim e espero que continue dessa mesma forma, a sua amizade é muito importante. Ale, de você não precisa nem falar, minha grande amiga peruana, obrigada por toda a convivência, tanto na faculdade, quanto na vida.

Aos outros colegas de pós-graduação: Mônica, Larissa, Bruna, Samira, Jorge e Roberta, pelos momentos que dividimos experiências e convivência. Em especial à Betinha, grande amiga carioca que conheci aqui em Bauru e que quero levar para sempre, obrigada por me receber na sua casa e ser tão companheira. E à Mô, por ter feito parte de tudo isso também, principalmente pelas tantas risadas que demos juntas.

*Agradeço a todos os colegas de pós-graduação que eu conheci durante esse mestrado, em especial: **Letícia Korb, Fernando Trigueiro e Lucas Mendes**. Desejo muito sucesso a todos vocês.*

*Aos alunos ingressantes na nova turma de mestrado em Periodontia da FOB: **Rafael, Paula, Lucas, Jeffrey e Maria Alejandra**. Em especial a **Paula Cunha**, que já chegou em Bauru entrando na minha vida. Obrigada!*

*Aos funcionários do CIP: **Rafaela, Marcelo, Renato e Márcia**. Afinal, o CIP foi minha segunda casa em Bauru. Obrigada pelas risadas e por serem sempre solícitos.*

*Ao Instituto de Física de São Carlos – USP, na pessoa do **Prof. Dr. Vanderley Bagnato**. E em especial a funcionária **Lilian Moriyama**, que teve sempre o esmero de me ajudar na aplicação dos lasers e acabou se tornando uma grande conhecida em São Carlos. Obrigada!*

*Ao meu amigo, **Maurício Badaró**. Mau, você é um irmão, obrigada por sempre acreditar que eu ia conseguir. Você fez parte dessa vitória.*

*A minha amiga e eterna dupla de faculdade **Valéria Matos**. Grande companheira, que sempre dividiu momentos bons e ruins comigo. É uma pena não poderes estar aqui, mas saiba que desejo o teu sucesso sempre!*

*A minha amiga **Priscilla Gonçalves**. Agradeço por ter te conhecido ainda na graduação, por ter te convencido a vir para Bauru, por ter morado contigo, por seres acima de tudo uma grande irmã, que está sempre por perto para chamar atenção ou para elogiar. Obrigada por dividir esse dia comigo.*

*A minha amiga **Nádja Teixeira**. Conheci você aqui em Bauru, vinda de Alfenas-MG, mas certamente mais paraense do que eu. Você se revelou uma pessoa muito especial, amiga e companheira. Obrigada por tudo e fique sabendo que quero você pra sempre comigo!*

*As minhas eternas amigas de Belém: **Rafaela, Luciane, Tally, Juliana, Belisa e Laís**. A nossa amizade, mesmo à distância, é um dos pilares que sustenta a minha vida.*

*Aos outros amigos que fiz em Bauru, em especial: **Juliana, Andressa, Tânia, Bruna, Luis Fernando Simoneti e Marlos**. Obrigada pela amizade e dedicação. Vocês são muito importantes.*

*Às **turmas de graduação** que eu tive o prazer de conhecer. Principalmente à **XLVIII, XLIX e L**. As quais eu convivi desde o primeiro ano de periodontia. Vocês foram e serão sempre fonte de conhecimento, acreditem, eu aprendi muito mais com vocês do que vocês comigo. Beijos!*

*Agradeço aos estagiários **Luisa, Lucas e Martha** por terem sido tão dedicados durante esse ano de convivência e aos estagiários ingressantes nesse ano de 2013 desejo boa sorte e sucesso.*

*A Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, na pessoa do diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira**, pelo apoio institucional, acolhimento e confiança desde que cheguei em Bauru.*

“Ainda que eu falasse línguas, as dos homens e dos anjos, se eu não tivesse o amor, seria como sino ruidoso ou como címbalo estridente. Ainda que eu tivesse o dom da profecia, o conhecimento de todos os mistérios e de toda ciência; ainda que eu tivesse toda fé, a ponto de transportar montanhas, se eu não tivesse o amor, eu não seria nada”.

Cor (13, 1-2.8.13)

RESUMO

Um dos principais problemas em Periodontia refere-se à redução microbiana subgengival e tornar a superfície radicular biocompatível, a qual pode ser realizada por raspagem e alisamento radicular, tratamentos químicos, laser em alta intensidade ou terapia fotodinâmica. O objetivo dessa pesquisa foi de comparar os efeitos de raízes humanas tratadas por diferentes técnicas como terapia fotodinâmica, Er:YAG, Nd:YAG, raspagem e alisamento radicular e ácido cítrico + tetraciclina, na proliferação de fibroblastos gengivais (FGH) e células de granulação óssea (GO) humanos. Para tal, foram preparados 45 fragmentos radiculares de 25 dentes extraídos por razões periodontais e que foram divididos em 6 grupos: controle com células (CC), controle com fragmento raspado (CD), laser de Er:YAG (ER - 60mJ, 10pps, varredura, distância focal 12mm, 10Hz, 10s, 2940nm), laser de Nd:YAG (ND - 0,5W, contato, 15Hz, 10s, 1640nm), terapia fotodinâmica (PDT - laser de InGaAIP - 30mW, distância focal ≤ 1 mm, 45J/cm², 30s, 660nm + azul de toluidina O), e ácido cítrico com tetraciclina (AC). As células foram cultivadas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução antibiótica e 0,5% de anfotericina B. Foram plaqueadas 2×10^3 células, na sexta passagem, em placas de 96 poços. Após 24h o meio foi substituído por meio condicionado pelos fragmentos tratados, com exceção do grupo controle de células (CC), que recebeu meio convencional. A viabilidade celular foi medida através do teste do MTT nos períodos de 24, 48, 72 e 96h. Os dados em forma de densidade óptica e porcentagem de crescimento foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA a três critérios complementado pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos controle CC e CD ($p > 0,05$). Para as células FGH em relação ao controle, houve maior estímulo após 48 e 72h no grupo PDT, após 72h no grupo ND, e após 72 e 96h no grupo AC ($p < 0,05$). Para as células GO, em relação ao controle, houve maior crescimento apenas no período de 72h para o grupo ND ($p < 0,05$). Ao comparar os grupos experimentais e ambos os tipos celulares, após transformação em porcentagem de crescimento, houve diferença estatisticamente significativa para o grupo ER nos períodos de 72 e 96h para as células FGH ($p < 0,05$). Concluiu-se que todos os tratamentos, com exceção da raspagem e alisamento radicular, estimularam a proliferação de fibroblastos gengivais humanos e somente o tratamento com Nd:YAG estimulou a proliferação de células de granulação óssea humana.

Palavras-chave: Lasers. Fotoquimioterapia. Técnicas de Cultura de Células. Fibroblastos.

ABSTRACT

Influence of roots treated with laser and acid on proliferation of human gingival fibroblasts and osseous granulation cells

One of the main problems in Periodontics is how to eliminate the subgingival bacteria and to convert the root surface in a biocompatible environment. These results can be achieved by scaling and root planning, chemical treatment, high energy lasers or photodynamic therapy. The aim of this study was to compare the effects of human root fragments treated by different techniques as photodynamic therapy, Er:YAG, Nd:YAG, scaling and root planning and citric acid plus tetracycline on proliferation of human gingival fibroblasts (HGF) and human osseous granulation cells (OG). Forty-five root fragments from 25 human teeth extracted by periodontal indication were divided in six groups: control with cells (CC), scaled fragment control (SC), Er:YAG laser (ER - 60mJ, 10pps, scanning, focal distance 12mm, 10Hz, 10s, 2940nm), Nd:YAG laser (ND – 0.5W, contact, 15Hz, 10s, 1640nm), photodynamic therapy (PDT – InGaAlP, 30mW, 45J/cm², 30s, 660nm, toluidine blue O), citric acid plus tetracycline (CA). The cells were grown in DMEM medium with 10% of bovine fetal serum, 1% of antibiotic solution and 0.5% amphotericin B. In 96-well plates 2 x 10³ cells in the sixth passage were plated. After 24h the medium was replaced by medium conditioned by the treated fragments with exception of cell control group (CC) which received regular medium. Cell viability was measured by MTT test at 24, 48, 72 and 96h. Data was described in optic density and percentage of growth and was analyzed by ANOVA test complemented by Tukey's test at a significance level of 5% ($p < 0.05$). There was no statistical differences between control groups CC and SC ($p > 0.05$). For HGF cells in relation to control, there was a higher growth after 48h and 72h at PDT group, after 72h at ND group, after 72h and 96h at CA group ($p < 0.05$). For OG cells in relation to control, there was a higher growth only at 72h-period at ND group ($p < 0.05$). After transformation in percentage of growth and comparison among experimental groups and both cell types, there was a statistical significant difference at ER group at 72h and 96h-period ($p < 0.05$). It was concluded that all treatments but scaling and root planning stimulated the proliferation of human gingival fibroblasts and only the Nd:YAG treatment stimulated the proliferation of human osseous granulation cells.

Keywords: Lasers. Photochemotherapy. Cell Culture Techniques. Fibroblasts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema adaptado (GENOVESE, 2000) de onda eletromagnética...	29
Figura 2 -	Esquema do espectro eletromagnético.....	30
Figura 3 -	Esquema adaptado de um Laser de Alta intensidade.....	32
Figura 4 -	Esquema adaptado do Laser de Baixa intensidade de diodo (GENOVESE, 2000).....	32
Figura 5 -	A: Esquema da confecção dos espécimes; B: Fotografia de uma amostra com dimensões.....	60
Figura 6 -	Raspagem e alisamento radicular de um dos fragmentos.....	63
Figura 7 -	Aplicação do Laser de Er:YAG.....	63
Figura 8 -	Aplicação do Laser de Nd:YAG.....	63
Figura 9 -	Aplicação da Terapia fotodinâmica.....	65
Figura 10 -	Aplicação do Ácido Cítrico + Tetraciclina.....	65
Figura 11 -	Esquema para a cultura de células (FGH e GO). As células FGH e GO foram cultivadas em garrafas de cultura celular com meio de cultura Eagle modificado por Dubelco, mantidas em estufa a uma temperatura de 37°C.....	67
Figura 12 -	Placa de 96 poços onde a primeira metade foi plaqueada com fibroblastos gengivais (FGH) e a segunda metade com células de granulação óssea (GO). Grupos experimentais em sextuplicata. CC = controle positivo somente células, CD= controle raspagem, ER = Er:YAG, ND= Nd:YAG, PDT = terapia fotodinâmica, AC = ácido cítrico, BK = blank.....	68
Figura 13 -	A: Tubos Falcon com meio DMEM sendo condicionado com os fragmentos de raiz tratados; B: Meio sendo condicionado na estufa; C: Fragmentos condicionando o meio e D: Placa de 96 poços com o meio condicionado.....	69
Figura 14 -	Cristais de formazan no interior das células.....	69
Figura 15 -	A: Placa de 24 horas para MTT; B: Placa de 48 horas para MTT; C: Placa de 72 horas para MTT; C: Placa de 96 horas para.....	71
Figura 16 -	Espectrofotômetro (Laboratório de Bioquímica da FOB/USP).....	71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Análise entre os grupos Controle de Células (CC) e Controle de Dentes (CD). ($p>0,05$).....	77
Gráfico 2 -	Análise entre o Controle (CC) e o Er:YAG (ER). ($p>0,05$).....	78
Gráfico 3 -	Análise entre os grupos Controle (CC) e Nd:YAG (ND). Letras diferentes = $p<0,05$	79
Gráfico 4 -	Análise entre os grupos Controle (CC) e Terapia fotodinâmica (PDT). Letras diferentes = $p<0,05$	79
Gráfico 5 -	Análise entre os grupos Controle (CC) e Ácido Cítrico (AC). Letras diferentes = $p<0,05$	80
Gráfico 6 -	Análise de FGH entre os grupos experimentais. Letras diferentes = $p<0,05$	81
Gráfico 7 -	Análise de GO entre os grupos experimentais. Letras diferentes = $p<0,05$	82
Gráfico 8 -	Porcentagem de crescimento entre os grupos experimentais, considerando-se o período de 24 horas como 100%. Letras diferentes = $p<0,05$	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros do Laser de Er:YAG.....	61
Tabela 2 -	Parâmetros do Laser de Nd:YAG.....	62
Tabela 3 -	Parâmetros do Laser de InGaAlP.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
≤	Maior ou igual
°C	Graus Celsius
µg/ml	Micrograma por mililitro
µm	Micrograma
⁵¹ Cr	Cromo radioativo
ANOVA	Teste de análise de variância
CO₂	Dióxido de Carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Meio Eagle modificado por Dubelco).
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetraacético)
e-PTFE	Expanded polytetrafluoroethylene membrane (Membrana de politetrafluoretileno expandida)
Er,Cr:YSGG	Érbio, cromo, ítrio, escândio, gálio e granada
Er:YAG	Érbio, ítrio, alumínio e granada
FGH	Fibroblastos Gengivais Humanos
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
GaAs	Arseneto de Gálio
GaAsAl	Arseneto de Gálio e Alumínio
GO	Granulação óssea
h	Hora(s)

HeNe	Hélio Neônio
HILT	High-Intensity Laser Therapy (Terapia com laser de alta intensidade)
Hz	Hertz - frequência
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
IGF	Insulin-like growth fator (fator de crescimento da insulina)
In	Índio
InGaAlP	Índio, gálio, alumínio e fósforo
InGaAsP	Arseneto de índio, gálio alumínio e fósforo
J	Joule - energia
J/cm²	Joule por centímetro quadrado - densidade de energia
J/cm²/pulso	Joule por centímetro quadrado por pulso - densidade de energia por pulso
LED	Light-emitting diode (Diodo de emissão de luz)
LILT	Low-Intensity Laser Therapy (terapia com laser de baixa intensidade)
LLLT	Low-Level Laser Therapy (terapia com laser em baixa potência)
MET	Microscópio eletrônico de transmissão
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
mJ/pulso	MiliJoule por pulso - Densidade de energia por pulso
mm	Milímetro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazólio
mW	Miliwatt - potência
Nd:YAG	Neodímio, ítrio e granada
nm	Nanômetros

PCNA	Proliferating cell Nuclear antigen (Antígeno de proliferação celular)
PDGF-BB	Platelet Derived Growth Factor-BB Fator de crescimento derivado de plaquetas)
PDT	Terapia fotodinâmica
pH	Potência hidrogeniônico
pps	Pulsos por segundo
RAR	Raspagem e alisamento radicular
s	Segundo(s)
SLAT	Selective Laser Treatment (tratamento de laser seletivo)
SP	São Paulo
TGF-β1	Transforming growth factor beta (fator de crescimento tumoral beta)
UFC	Unidade formadora de colônias
USP	Universidade de São Paulo
W	Watts – potência
λ	Lambda – comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	TRATAMENTO QUÍMICO DA RAIZ.....	25
2.2	HISTÓRICO DO LASER	28
2.2.1	Laser de Er:YAG.....	34
2.2.2	Laser de Nd:YAG.....	41
2.3	TERAPIA FOTODINÂMICA	45
2.4	CÉLULAS DE GRANULAÇÃO ÓSSEA.....	49
3	PROPOSIÇÃO	53
4	MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1	SELEÇÃO DOS DENTES	59
4.2	PREPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS	59
4.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	60
4.4	CULTURA DE CÉLULAS	67
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	73
5	RESULTADOS	75
5.1	COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLES	77
5.2	COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS (LASERS E ÁCIDO) EM RELAÇÃO AO CONTROLE (CÉLULAS)	78
5.3	COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS EXPERIMENTAIS (LASERS E ÁCIDO).....	81
5.4	COMPARAÇÃO ENTRE OS TIPOS DE CÉLULAS (GO E FGH)	82
6	DISCUSSÃO	85
7	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	97
	APÊNDICES	107
	ANEXOS	117

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas em Periodontia refere-se à redução microbiana subgengival. A doença periodontal é uma patologia infecciosa inflamatória de etiologia microbiana, sendo o biofilme bacteriano o fator etiológico primário na inflamação gengival (MONTEIRO; MOREIRA, 2011). A presença de endotoxinas pode constituir uma fonte de toxicidade, quando fixadas no cimento radicular, favorecendo a destruição progressiva das estruturas do periodonto de sustentação (ADRIAENS, DE BOEVER, LOESCHE, 1988; ADRIAENS et al., 1988; LINDHE KARRING; LANG; 2005).

Alguns autores relataram que há invasão bacteriana até mesmo na superfície pré-dentinária da parede pulpar e nos 300µm mais externos do cimento após a raspagem (ADRIAENS, DE BOEVER, LOESCHE, 1988; ADRIAENS et al., 1988) sendo que outros, demonstraram através de técnicas imunohistoquímicas que os polissacarídeos estavam presentes apenas na superfície do cimento exposta à doença periodontal (HUGHES; SMALES, 1986; HUGHES; AUGER; SMALES, 1988).

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

O tratamento periodontal inicia-se com raspagem e alisamento radicular e a motivação do paciente, visando melhorar a higienização e sua saúde bucal. A raspagem e o alisamento radicular formam *smear layer* e não promovem a descontaminação total do cimento, dificultando a reparação periodontal. Assim, substâncias químicas modificadoras da superfície radicular, como ácido cítrico, tetraciclina ácida ou o EDTA, passaram a ser utilizadas para remoção de *smear layer*, descontaminação, exposição da superfície radicular sadia com fibras colágenas (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2000; SHETTY; DINESH; SESHAN, 2011). Sabendo disso, as buscas para a solução desse problema começaram há muito tempo, com a instrumentação mecânica manual, rotatória, ultrassônica, e também o emprego de métodos alternativos como a aplicação de agentes ácidos, quelantes e mais atualmente o laser, tendo em vista

que as experiências coletadas em relação à redução da quantidade de bactérias tornam o método recomendado em Periodontia (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

O laser vem sendo utilizado em diversas áreas e especialidades da medicina e odontologia. Sabemos que este tipo de tratamento parece bastante conservador e atende aos objetivos da odontologia moderna, mas ainda não consegue ser uma realidade para a maioria dos profissionais da odontologia (MELLO, 2001). O tratamento dentário consegue ser consideravelmente menos doloroso com a utilização do laser, quando comparado aos métodos convencionais utilizados na odontologia (SMITH; SETCHELL; HARTY, 1993).

O emprego do laser como método de biomodificação radicular foi descrito em alguns estudos (FEIST et al., 2003; GUTKNECHT; EDUARDO, 2004; FRANCO; GREGHY; ASSIS, 2005). De acordo com sua interação com os tecidos irradiados, os lasers podem ser classificados em dois grandes grupos: lasers cirúrgicos (operam em alta potência) e os lasers não cirúrgicos ou terapêuticos (operam em baixa potência) (PINHEIRO; BRUGNERA JUNIOR; ZANIN, 2010). Entre os lasers em alta intensidade para tratamento de tecido duro estão: Nd:YAG (neodímio), CO₂ (dióxido de Carbono), Er:YAG (Érbio), Er,Cr:YSGG (Érbio, cromo). E os lasers em baixa intensidade mais comuns são normalmente variações do gálio, como o InGaAsP e o GaAsAl (WALSH, 1997; GENOVESE, 2000).

A Terapia Fotodinâmica é uma modalidade de tratamento que se baseia na ativação, por uma fonte de luz, de agentes fotossensibilizadores exógenos ou corantes (FERNANDES et al., 2010; SALMERON et al., 2013). Consiste no uso de um corante (azul de toluidina) associado a um laser em baixa intensidade com comprimento de onda correspondente ao corante, como por exemplo, o laser de InGaAsP que emite espectro de luz vermelha visível com comprimentos de onda que variam de 600nm a 680nm e potência entre 10 a 50mW (WALSH, 1997; GENOVESE, 2000). A reação química de oxidação gerada pela interação desses componentes é capaz de matar bactérias, promovendo descontaminação da superfície radicular. O efeito antimicrobiano pode ser atingido quando uma droga fotossensibilizadora é ativada por uma luz em baixa intensidade (laser ou LED) gerando substâncias que podem danificar e, em último caso, matar a célula tratada (PINHEIRO; BRUGNERA JUNIOR; ZANIN, 2010). A terapia fotodinâmica é um tratamento coadjuvante efetivo da raspagem e alisamento radicular.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para fins didáticos, esta revisão da literatura será dividida em tópicos abordando os diferentes tratamentos químicos de raiz, o histórico do laser, sua utilização como método de biomodificação radicular e o emprego da terapia fotodinâmica como método de descontaminação radicular.

2.1 TRATAMENTO QUÍMICO DA RAIZ

Register e Burdick (1975) foram os primeiros a sugerir o condicionamento ácido da superfície radicular, visando um tratamento químico da raiz. Pode-se verificar, posteriormente, que esse tratamento apresenta efeitos de abertura dos túbulos dentinários, remoção da *smear layer* (THEODORO et al., 2002; SHETTY; DINESH; SESHAN, 2011; BARROS, 2013), assim como a exposição de fibras colágenas que tem quimiotaxia para fibroblastos e aumento da rugosidade superficial da raiz (COGEN et al., 1984).

Aleo, De Renzis e Farber (1975) realizaram um estudo para determinar o efeito das endotoxinas sobre a fixação das células em superfícies radiculares. Para confrontar uma avaliação *in vivo* deste fenômeno, um sistema *in vitro* foi montado utilizando dentes humanos extraídos por razão periodontal e sobre eles foram cultivados fibroblastos gengivais humanos. Os dentes foram divididos em três grupos: um sem tratamento, um tratado com fenol a 45% e água a 60°C durante 1 hora, seguido de lavagens múltiplas com etanol e um grupo onde o cemento foi removido mecanicamente. Dentes sem envolvimento periodontal (dentes inclusos) foram usados no grupo controle. Quando as endotoxinas foram removidas da raiz por extração com fenol, as células cresceram normalmente na superfície da raiz. Na análise em MEV pôde-se observar que não houve adesão celular às superfícies radiculares periodontalmente comprometidas e que o tratamento com fenol, bem como a raspagem mecânica resultou em adesão celular. Os resultados sugeriram que a endotoxina que está presente na superfície radicular doente prejudica a adesão de fibroblastos.

No mesmo ano, Register e Burdick (1975) realizaram um estudo que tratava de descontaminação radicular com uso de diversos ácidos. Tiveram por objetivo determinar uma concentração e um tempo de aplicação adequados para seu uso e verificar se esses parâmetros seriam capazes de induzir a cementogênese. O ácido cítrico com pH1 foi o melhor e o tempo de aplicação ideal foi de 2-3 minutos.

Boyko, Brunette e Melcher (1980) extraíram o ligamento periodontal e a coroa de molares de suínos e determinaram a área na superfície radicular desses dentes. Fibroblastos derivados do ligamento periodontal foram cultivados *in vitro* nas raízes, algumas das quais foram desmineralizadas durante vários períodos de tempo com ácido cítrico, ácido clorídrico ou EDTA. O número de células aderidas à raiz foi contado e expresso como unidade de área. Concluíram que fibroblastos derivados do ligamento periodontal aderem melhor à superfície radicular desmineralizada do que em superfícies não-desmineralizadas.

Com o objetivo de comparar os efeitos do ácido cítrico sobre as superfícies radiculares e determinar se as superfícies tratadas com ácido cítrico favoreceriam a adesão e proliferação de fibroblastos gengivais humanos, foi que Cogen, Garrison e Weatherford (1983) desenvolveram uma pesquisa. Dentes extraídos por razões periodontais foram divididos em 4 grupos: 1- sem nenhum tratamento; 2- somente ácido cítrico pH1 por 3 minutos; 3- somente raspagem e 4- raspagem + ácido cítrico pH1 por 3 minutos. Fibroblastos gengivais humanos foram cultivados por diferentes períodos de tempo sobre as raízes. A viabilidade celular foi analisada a partir de um marcador radioativo (^{51}Cr). Os resultados obtidos do experimento, tanto após 3 horas quanto após 24 horas, indicaram que nenhuma das amostras tratadas ou não tratadas proporcionou efeito negativo sobre a viabilidade dos fibroblastos gengivais humanos. Mas pôde-se observar que as raízes tratadas com raspagem somente ou raspagem associada ao ácido cítrico promoveram fixação e proliferação celular, independente de já terem sido expostas ao ambiente de bolsas periodontais.

Um ano mais tarde Cogen et al. (1984) realizaram outro estudo com ácido cítrico sobre a superfície radicular. Para isso, obtiveram dentes humanos extraídos por razões periodontais. Os dentes foram divididos em 4 grupos: um com dentes que não passaram por tratamento algum, um grupo somente com ácido cítrico pH1 por 3 minutos, um grupo somente raspagem e um grupo de raspagem e ácido cítrico pH1 por 3 minutos. Fibroblastos gengivais humanos foram cultivados nas raízes e

passaram por período de incubação de 72 horas. A capacidade das células crescerem e se aderirem à superfície radicular foi medida por meio de avaliação da intensidade de coloração histológica e observação em MEV. Os resultados indicaram que as raízes raspadas e desmineralizadas com ácido cítrico promoveram a fixação e o crescimento celular. Além disso, não houve diferenças morfológicas significativas nas células que foram cultivadas em raízes que haviam sido apenas raspadas em comparação com que tiveram raspagem e ácido cítrico. Em ambas as situações, as células também exibiram morfologia típica de fibroblastos gengivais humanos. Pôde-se concluir que a melhor forma de tratamento radicular seria a combinação do tratamento de raspagem com aplicação do ácido cítrico, apesar dos fibroblastos também terem se aderido e proliferado nas superfícies radiculares somente raspadas.

O objetivo da pesquisa de Fardal e Lowenberg (1990) foi de avaliar a adesão e a proliferação de fibroblastos gengivais humanos às raízes dentárias ao longo de 21 dias *in vitro*. Um total de 120 fragmentos radiculares foi dividido em grupos experimentais: raiz com doença periodontal raspada; raiz com doença periodontal raspada + ácido cítrico; raiz com doença periodontal sem tratamento; raiz com doença periodontal somente com ácido cítrico; raiz não doente tratada com ácido cítrico e collagenase; raiz não doente tratada com EDTA e raiz não doente tratada com EDTA e collagenase. Os resultados obtidos demonstraram que o melhor período de fixação celular foi nos primeiros 10 dias de experimento. Foram observadas diferenças estatísticas em relação à fixação e orientação celular nos fragmentos radiculares e às variáveis. Pôde-se observar que a raspagem e alisamento radicular acarretam melhora nas raízes doentes, que a desmineralização com ácido cítrico quando associada à raspagem ocasiona uma melhora comparável à raízes não doentes e que a exposição das fibrilas de colágeno resultante da desmineralização ácida não é a única razão para a adequação da superfície radicular, e sim uma combinação dessas fibrilas expostas e a criação de um ambiente adequado.

Sant'Ana et al. (2007) realizaram um estudo com o objetivo de analisar a influência do PDGF-BB, IGF e TGF- β 1, isoladamente, combinados e associados ou não ao condicionamento radicular com ácido cítrico, na taxa de proliferação e adesão das células do ligamento periodontal *in vitro*. As células do grupo teste foram

cultivadas em meio com PDGF-BB, IGF e TGF- β 1, ou uma combinação dos três e o grupo controle não recebeu nenhum fator de crescimento. As amostras foram contadas em triplicata de 1, 3, 5 e 7 dias após o plaqueamento. Para o ensaio de adesão, 30 fragmentos radiculares foram distribuídos em 10 grupos: RAR, RAR+fatores de crescimento, RAR+ácido cítrico com tetraciclina, RAR+ácido cítrico com tetraciclina+fatores de crescimento. As maiores taxas de proliferação celular foram observadas no terceiro dia para todos os grupos. Os grupos tratados por ácido cítrico com tetraciclina mostraram um aumento do número de células aderidas à raiz, especialmente para a combinação da RAR+ácido cítrico com tetraciclina+fatores de crescimento, com diferenças significantes ($p < 0,05$) para os grupos tratados somente com RAR. Ou seja, a combinação de condicionamento com ácido cítrico e cultura com fatores de crescimento estimulou a resposta mitogênica e favoreceu a adesão de células do ligamento periodontal *in vitro*, sugerindo um importante e possível papel na regeneração periodontal.

2.2 HISTÓRICO DO LASER

A primeira hipótese sobre a luz foi de Isaac Newton, entre 1675 e 1704. Ele já dizia que a luz, apesar de parecer contínua aos olhos humanos, seria constituída de pequenas partículas (fótons), emitidas em grande velocidade por uma fonte luminosa. Newton também descobriu que a luz poderia se dividir em várias cores através do uso de um prisma (PINHEIRO; BRUGNERA JÚNIOR; ZANIN, 2010).

Os princípios acerca da teoria do laser foram desenvolvidos em 1917, quando Albert Einstein lançou as bases para emissão estimulada em seu tratado “teoria quântica da radiação”. Foi Einstein quem sugeriu que um feixe de luz não seria apenas uma onda eletromagnética, e sim que a luz seria composta de pequenas entidades, com uma energia proporcional à frequência da onda luminosa: os fótons (PINHEIRO; BRUGNERA JÚNIOR, ZANIN, 2010).

O primeiro laser foi demonstrado, em 1960, por Theodore Maiman, e era um laser de rubi. Que foi obtido pela excitação de uma roda de rubi, com pulsos luminosos intensos. Os princípios físicos do funcionamento do laser foram descritos por Schawlow e Townes em 1958 (MORITZ et al., 2006; PINHEIRO; BRUGNERA

JÚNIOR; ZANIN, 2010). O físico americano Gordon Gold deu o nome de Laser ao sistema, que é a abreviatura de *Ligh Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) e que viria a propiciar ao mundo a abertura de novas fronteiras, trazendo revolução à ciência em várias áreas como a microcirurgia e à exploração espacial (PINHEIRO; BRUGNERA JÚNIOR; ZANIN, 2010).

O laser é uma radiação não ionizante, concentrada, que quando entra em contato com os tecidos resulta em efeitos térmicos, fotoquímicos e não lineares. Diferente de outras formas de radiação como o raio-X ou gama, a radiação laser não é invasiva quando usada com finalidade terapêutica e tem boa tolerância pelos tecidos, na grande maioria dos seus comprimentos de onda (PINHEIRO; BRUGNERA JÚNIOR; ZANIN, 2010).

O raio laser consiste em ondas que possuem um comprimento específico, que corresponde à distância entre dois “picos” máximos ou mínimos, medido na direção em que a onda está se propagando. A onda eletromagnética tem como principais características: frequência, amplitude e comprimento de onda. A frequência é medida pelo número de cristas ou “picos” que passam por um ponto estacionário em 1 segundo. A amplitude é altura do topo de uma crista até a concavidade da outra e indica a força da onda. E o comprimento de onda é a distância entre duas sucessivas cristas (Figura 1) (GENOVESE, 2000).

Figura 1 - Esquema adaptado (GENOVESE, 2000) de onda eletromagnética

Sabe-se que à medida que comprimento de onda diminui, ocorre um aumento da sua energia e vice-versa. Dessa forma, o laser com menor comprimento

de onda tem mais energia. Aos olhos humanos, o comprimento de onda significa as cores (PINHEIRO; BRUGNERA JÚNIOR; ZANIN, 2010).

A luz branca contém todas as cores. Ao passar pelo prisma ocorre uma decomposição, que separa a luz branca em seus diversos componentes. Essas várias cores, projetadas em um anteparo, se diferenciam pelos seus chamados comprimentos de onda ou frequências. Nesse caso, as cores passam de uma a outra continuamente, tendo o espectro contínuo que varia do vermelho ao violeta. Cada uma das cores possui comprimento de onda específico. Sendo a cor violeta com o menor comprimento de onda e a vermelha com o maior. A luz visível a olho nu está em um comprimento de onda que varia de $\lambda 400\text{nm}$ e $\lambda 700\text{nm}$ e cobre as emissões luminosas da cor violeta até a cor vermelha. Sendo assim, os lasers que emitem radiação com comprimentos de onda acima ou abaixo desse espectro visível são considerados invisíveis a olho humano (BAGNATO, 2001; PINHEIRO; BRUGNERA JÚNIOR; ZANIN, 2010) (Figura 2).

Figura 2 - Esquema do espectro eletromagnético

O laser é monocromático, por que a energia carregada pelo fóton estimulante e pelo fóton emitido é a mesma. Se for observado no espectro, podemos vê-lo como apenas uma linha, mostrando que tem somente um comprimento de onda, enquanto que uma luz incandescente é formada por vários comprimentos de onda. O caráter unidirecional do laser se deve ao fato de que as ondas caminham na mesma direção. E também é coerente, visto que ondas sucessivas de radiação tem todas a mesma direção e o mesmo comprimento de onda (BAGNATO, 2001).

Os lasers podem ser classificados de várias formas. Uma delas é a classificação de acordo com a sua ação terapêutica, em lasers cirúrgicos e lasers

clínicos. Também podem ser classificados de acordo com o seu funcionamento, em contínuo ou pulsátil, e ainda com relação à natureza do seu meio ativo em sólidos, gases ou semicondutores (WALSH, 1997; GENOVESE, 2000). Também podem ser classificados em lasers cirúrgicos ou HILT (High-Intensity Laser Therapy), os não cirúrgicos, terapêuticos, LILT (Low-Intensity Laser Therapy), ou ainda laser em baixa potência, LLLT (Low-Level Laser Therapy) e os SLAT (Selective Laser Treatment) (PINHEIRO; FRAME, 1994).

Mais atualmente os lasers devem ser classificados como laser ablativo ou não ablativo, considerando a função básica do seu sistema, ou seja, a capacidade de remover ou não tecidos ou materiais (PINHEIRO; BRUGNERA JÚNIOR; ZANIN, 2010).

Um laser em alta intensidade consiste principalmente em três componentes: (1) meio ativo; (2) cavidade óptica e (3) fonte de energia.

- (1) Meio ativo: pode ser líquido, gasoso ou sólido. É a parte do laser que contém os átomos ou moléculas, as quais contêm os elétrons que, através dos saltos de níveis de energia emitem luz (fótons), que finalmente constituirão o raio laser.
- (2) Cavidade óptica: também chamada de ressonador. Tem a função de fazer com que os fótons que emergem do sistema voltem para ele, produzindo mais e mais emissão estimulada. O que é feito por meio de dois espelhos nas extremidades. Um na saída, que é parcialmente refletivo, portanto uma parte da luz passa por ele para fora e outra é refletida. E outro que está na outra extremidade, frente a frente, que é 100% refletivo.
- (3) Fonte de energia: é sempre uma fonte externa. Tem a função de produzir estados excitados, para que nos decaimentos haja também produção de luz. Atua no meio ativo, emitindo fótons sobre ele, fazendo com que a maioria dos átomos fique excitada. Estágio esse que é fundamental para a produção do laser (Figura 3) (GENOVESE, 2000; BAGNATO, 2001).

Figura 3 - Esquema adaptado de um Laser de Alta intensidade

O laser em baixa intensidade pode funcionar de várias maneiras, mas a mais comum delas é a utilização de um semicondutor de cristal de diodo de arseneto de gálio (GaAs) confeccionado em laboratório, podendo estar dopado por diversos outros elementos, dependendo do comprimento de onda desejado, como por exemplo o In (Índio), que dopa o cristal de diodo para emitir a luz vermelha (Figura 4) (ZEZELL et al., 2001; GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

Figura 4 - Esquema adaptado do Laser de Baixa intensidade de diodo (GENOVESE, 2000)

Os primeiros estudos do laser na odontologia foram desenvolvidos por Stern e Sogannaes (1964). Eles começaram trabalhando com um laser de rubi em esmalte e dentina e descobriram que houve redução da permeabilidade dentinária e também uma desmineralização do esmalte. Não existe um tipo de laser universal, que sirva para todos os casos e indicações. Por isso o operador precisa ter conhecimento

para poder decidir qual o melhor tipo de laser para determinada situação, qual o comprimento de onda, a energia e o modo o qual vai ser usado (pulsado, contínuo, contato ou sem contato) (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

O tratamento periodontal com laser pode favorecer o reparo das estruturas do periodonto, podendo também auxiliar no tratamento de hiperestesia dentinária após os procedimentos de raspagem radicular (MELLO, 2001). Atualmente o laser mais estudado em periodontia é o laser de Er:YAG, e vem mostrando resultados positivos, pois deixa uma superfície rugosa biocompatível com a adesão de fibroblastos. O laser de Er:YAG tem comprimento de onda ideal para os tecidos dentais, pois tem uma grande afinidade com a hidroxiapatita e água. Também consegue ser absorvido pelos tecidos dentais, o que promove uma alta precisão de corte gerando pouco calor (3°C) (PINHEIRO; BRUGNERA JÚNIOR; ZANIN, 2010). O laser de Er:YAG vem cada vez mais sendo utilizado na terapia periodontal (AKIYAMA et al., 2011). Possui um efeito bactericida com baixos níveis de energia, supondo então que seu uso é recomendado no tratamento de bolsas periodontais (PINHEIRO; BRUGNERA JÚNIOR; ZANIN, 2010).

A laserterapia, associada ao tratamento convencional na clínica periodontal, contribui consideravelmente para o sucesso do tratamento das doenças periodontais, devido às suas propriedades antiinflamatórias, analgésicas e antibacterianas, intensificando o processo de reparação sem causar danos (MDINARADZE, 2006).

Pode-se dizer então que o laser não consegue substituir as curetas periodontais, mas que age como um complemento eficaz no tratamento combinado de periodontite (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004). O procedimento preconizado para a utilização do laser em periodontite é: raspagem e alisamento radicular, com polimento mecânico da raiz e introdução da fibra no interior da bolsa, fazendo movimentos paralelos ao contorno da raiz (MYERS, 1991; WHITE; GOODIS; ROSE, 1991; MIDDA, 1992; GOLD; VILARDI, 1994).

2.2.1 Laser de Er:YAG

Aoki, Ando e Watanabe (1994), realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de avaliar a eficácia de um laser de Er:YAG com um sistema de fornecimento em forma de fibra para remoção de cálculo subgengival. Para tal, selecionaram 53 dentes extraídos por razão periodontal com uma camada de cálculo subgengival. Foram realizados 2 experimentos. No primeiro, o laser foi utilizado com irrigação em uma linha reta e em uma ampla área com nível de energia de 10 a 120mJ/pulso (3,5 a 42,4J/cm²/pulso) e taxa de repetição 10 pulsos por segundo. No segundo experimento, o laser foi utilizado com e sem irrigação a 30mJ/pulso e taxa de repetição de 10pps. As alterações morfológicas na área de utilização do laser no primeiro experimento foram observadas através de MEV, e a eficiência do laser também foi determinada. No segundo experimento foram comparadas as mudanças na morfologia da área, a eficiência do laser e as mudanças de temperatura com e sem a irrigação com água. O laser de Er:YAG utilizado com irrigação foi capaz de remover o cálculo subgengival de forma eficaz com cerca de 30mJ/pulso e uma densidade de energia de 10,6J/cm²/pulso e com 10pps. A ablação do tecido dentário com laser pôde ser observada dentro do cimento. Houve um pequeno aumento da temperatura na superfície radicular durante a raspagem com laser. Fica como sugestão que o laser de Er:YAG tem potencial para ser utilizado em raspagem subgengival clinicamente.

Anos mais tarde Aoki et al. (2000) realizaram um outro estudo com laser de Er:YAG, mas agora com o objetivo de avaliar sua eficiência e as alterações morfológicas e histológicas que pode causar na superfície da raiz comparadas às do ultrassom convencional. Utilizaram dois grupos, um de raspagem com laser e outro de raspagem com ultrassom. A aplicação do laser foi realizada com uma energia de 40mJ/pulso, 10 pps e com irrigação. A raspagem ultrassônica foi realizada de acordo com os padrões já estabelecidos clinicamente. Nos dois tipos de tratamento foi determinado o tempo necessário para se efetuar a raspagem, a área que foi raspada e as mudanças de temperatura que poderiam ocorrer. As características das superfícies raspadas foram examinadas por microscópio eletrônico de varredura. Os resultados obtidos foram que a remoção de cálculo subgengival no grupo irradiado por laser de Er:YAG foi equivalente ao nível de remoção com a raspagem

ultrassônica, e não pôde ser observada uma maior elevação térmica. Macroscopicamente conseguiram observar que a superfície radicular tratada com laser ficou um pouco mais áspera do que o grupo raspado por ultrassom. Na análise em MEV puderam observar microrrugosidades na superfície radicular tratada com o laser. Puderam concluir que apesar do Laser de Er:YAG ter produzido algumas modificações estruturais e térmicas na superfície da raiz, ele conseguiu remover tanto cálculo quanto a raspagem ultrassônica.

Franco, Gregghi e Assis (2005) desenvolveram uma pesquisa com o objetivo de avaliar as possíveis alterações ocorridas na superfície radicular irradiada com laser de Er:YAG através de MEV e a colocação de fragmentos radiculares em subcutâneo de ratos por períodos de 7, 14 e 18 dias, comparando com terapias convencionais. Os grupos experimentais foram: Grupo1 - Er:YAG (60mJ, 10pps, 15s); Grupo 2 - Er:YAG (100mJ, 10pps, 15s); Grupo 3 - RAR + aplicação de ácido cítrico com tetraciclina por 3 min e Grupo 4 - RAR (controle). Os resultados das análises histológicas e morfométricas mostraram maior número de células inflamatórias no grupo 4, no período de 7 dias. Nos grupos 1, 2 e 3, observou-se adesão de fibras colágenas às superfícies radiculares. A análise em MEV mostrou o aparecimento de crateras na superfície da raiz o que pode facilitar a adesão de fibrina nos estágios iniciais da inflamação, facilitando a inserção de fibras na região. Foram obtidos resultados favoráveis, mostrando que o laser de Er:YAG pode ser uma alternativa ao tratamento periodontal convencional.

Theodoro et al. (2002) realizaram um estudo com o objetivo de analisar morfológicamente através de microscopia eletrônica de varredura, utilizando laser de Er:YAG com dois parâmetros de energia, o tratamento de superfícies radiculares submetidas à raspagem e aplainamento radicular com instrumentos manuais. Foram utilizados 18 espécimes de superfícies radiculares que após serem submetidas à raspagem e aplainamento radicular foram divididos em 3 grupos. O grupo controle não sofreu nenhum tratamento; o grupo 2 foi irradiado com laser de Er:YAG (2,94 μ m) 47mJ/10Hz, focalizado com refrigeração durante 15 segundos e fluência de pulso de 0,57J/cm²; o grupo 3 foi irradiado com laser de Er:YAG (2,94 μ m) 83mJ/10Hz, focalizado com refrigeração durante 15 segundos e fluência de pulso de 1,03J/cm². Através da análise dos resultados concluíram que o laser de Er:YAG nos parâmetros utilizados no G3 promoveu a remoção de *smear layer* da

superfície radicular e exposição dos túbulos dentinários, porém causou aspecto irregular na superfície, apesar de não demonstrar crateras, fendas, fraturas e carbonização, necessitando de estudos que demonstrem a biocompatibilidade desta superfície no processo de reparo periodontal.

Feist et al. (2003) realizaram um estudo com o objetivo de analisar a biocompatibilidade das superfícies radiculares tratados por Er:YAG. A adesão e crescimento de fibroblastos gengivais humanos cultivados sobre superfícies radiculares tratadas por uma irradiação com laser Er:YAG ou cureta foram comparados. Os grupos experimentais foram, A: superfícies radiculares aplanadas com uma cureta de Gracey; grupo B: 2 irradiações com laser de Er:YAG com 60 mJ/pulso 10Hz; 10s com 10s de intervalo, 5J/cm²; e Grupo C: duas irradiações com laser de Er:YAG com 100 mJ/pulso 10s com 10s de intervalo, 5J/cm². Fragmentos (5mmx6mm) foram obtidos das superfícies experimentais. Em seguida 1 x 10³ células foram semeadas em cada fragmento. Um, dois e três dias após a cultura, as células foram fixadas e contadas em eletromicrografias. Os fibroblastos gengivais humanos aderiram e cresceram em todas as superfícies tratadas. O grupo B apresentou uma contagem significativamente maior de células do que os outros dois grupos nos dias 1 e 2. A contagem de células do grupo B foi significativamente maior que do grupo C. As superfícies tratadas com irradiação de 60 mJ/pulso de Er: YAG promoveram adesão e crescimentos mais rápidos do que as superfícies tratadas por alisamento radicular ou irradiação de 100 mJ/pulso.

Schwarz et al. (2003) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar *in vitro* e *in vivo* os efeitos de um laser de Er:YAG combinado com um sistema de detecção de cálculo por fluorescência induzido por radiação de 665nm de InGaAsP, um laser de diodo (GaAlAs) e somente a raspagem manual em superfícies radiculares de dentes com cálculo. Foram incluídas no estudo 24 raízes de dentes indicados para extração por motivos periodontais. Antes de serem extraídas, a parte mesial das raízes foi tratada e distribuída aleatoriamente nos seguintes grupos de tratamento: 1- laser de Er:YAG (160mJ/pulso, 19,4J/cm², 10 pulsos/segundo e irrigação) + sistema de detecção de cálculo por fluorescência induzido por InGaAsP (665nm), 2- GaAlAs (1,8W, relação de pulso e pausa de 1:10), ou 3- raspagem com instrumentos manuais (curetas HuFriedy). Imediatamente após esses tratamentos os dentes foram extraídos e os mesmos procedimentos foram repetidos para a parte distal da

raiz, tentando ser o mais próximo do realizado clinicamente. Para a observação em microscopia de luz as raízes foram cortadas em fatias de 30µm e foram feitas lâminas coradas com azul de toluidina. Parâmetros estabelecidos foram observados por um examinador cego e classificados como presentes ou ausentes (sim/não): a morfologia da superfície radicular, os efeitos térmicos secundários e os detritos remanescentes. Os resultados *in vivo* para o laser de Er:YAG foram que as superfícies radiculares ficaram lisas e homogêneas, houve um mínimo de perda de cimento e pôde ser observada a remoção do cálculo subgengival inclusive histologicamente, além disso não puderam ser observados danos térmicos. No caso do laser de diodo *in vivo* foram observados danos à superfície radicular, como ranhuras e crateras, observando-se o cimento cauterizado até a dentina, mas histologicamente não se observaram danos térmicos. Não foram observados danos térmicos em todos os grupos de tratamento *in vitro*, mas o grupo de Er:YAG teve uma maior remoção de cimento e o laser de diodo ainda apresentou grande quantidade cálculo subgengival. Com relação às alterações nas superfícies radiculares, o laser de Er:YAG apresentou cavidades rasas típicas de ablação e o laser de diodo não provocou alterações detectáveis. A raspagem e alisamento radicular tanto *in vitro* quanto *in vivo* apresentou uma superfície com aparência suave e aparecimento de riscos e crateras rasas, típicas. A remoção de cálculo com o laser de Er:YAG foi clinicamente semelhante a da raspagem com instrumentos manuais, o que foi confirmado histologicamente. O laser de diodo foi considerado inadequado para a remoção de cálculo, uma vez que a inspeção macroscópica revelou a presença de grande quantidade de cálculo subgengival. Os resultados encontrados sugerem que a utilização do laser de Er:YAG combinada com um sistema de detecção de cálculo pode ter uma remoção de cálculo seletiva e num nível equivalente ao proporcionado pela raspagem e alisamento radicular.

Theodoro et al. (2006) fizeram um estudo com o objetivo de avaliar através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a aderência dos componentes sanguíneos em superfícies radiculares irradiadas com lasers de Er:YAG (2,94µm) e de diodo GaAlAs (808nm) e os efeitos sobre a morfologia das superfícies radiculares irradiadas. 100 amostras de dentes humanos foram previamente aplainadas e raspadas com instrumentos manuais e divididas em 5 grupos: G1 (grupo controle); G2 Er:YAG (7,6J/cm²), G3 Er:YAG (12,9J/cm²); G4 laser de diodo (90J/cm²) e G5

laser de diodo ($108\text{J}/\text{cm}^2$). Em relação à adesão de componentes sanguíneos, o estudo não mostrou diferenças significantes entre o grupo controle e os grupos tratado com Er:YAG. A radiação de laser diodo foi menos eficaz que o grupo controle e que a radiação de laser de Er:YAG. Nenhum dos tratamentos propostos aumentou a adesão de componentes sanguíneos de forma significativa quando comparado ao grupo controle. Embora o laser de Er:YAG não tenha interferido na adesão de componentes sanguíneos foi o que causou mais mudanças na superfície da raiz, ao passo que o laser de diodo inibiu a aderência.

Gaspirc e Skaleric (2007) fizeram um estudo com o objetivo de avaliar os resultados clínicos em longo prazo do laser Er:YAG e comparar com retalho de Widman modificado. O lado esquerdo e direito da maxila dos pacientes foi atribuído aleatoriamente a cada um dos dois grupos: Grupo A (Er:YAG) e grupo B (retalho de Widman modificado). A profundidade de sondagem, recessão, o nível de inserção clínico, índice de placa e sangramento a sondagem foram registrados no início, 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 60 meses. Ambos os tratamentos resultaram em diminuição da profundidade de sondagem do índice de placa, do índice gengival e do sangramento a sondagem, houve aumento da recessão gengival e ganho de nível clínico de inserção. A redução na profundidade de sondagem no grupo A em relação ao grupo B foi estatisticamente significativa em 6, 12, 24 e 36 meses. Os ganhos no nível clínico de inserção foram significativamente maiores no grupo A em relação ao grupo B em 6, 12, 24 e 36 meses. O sangramento à sondagem foi significativamente menor no grupo A em relação ao grupo B em 3 e 6 meses. Todas as outras diferenças entre os grupos de tratamento não foram estatisticamente significantes. Chegaram à conclusão de que o tratamento cirúrgico de dentes unirradiculares com periodontite crônica utilizando o laser de Er:YAG tem melhores resultados na redução da profundidade de sondagem e no ganho de inserção clínica por até 3 anos em comparação com o retalho de Widman. Os resultados de curto prazo obtidos com ambos os tratamentos podem ser mantidos ao longo de 5 anos.

Segundo Ota-Tsuzuki et al. (2009) após o tratamento periodontal, o biofilme recém formado pode causar reações inflamatórias nos tecidos periodontais moles e duros e às vezes pode colocar o sucesso a longo prazo da terapia em risco. Seu estudo *in vitro* teve o objetivo de avaliar a rugosidade da superfície de dentina radicular e a adesão de *S. sanguinis* em superfícies radiculares. Quarenta raízes

bovinas foram aleatoriamente divididas nos seguintes grupos: sistema ultrassônico; Er:YAG; cureta manual; e um grupo controle com raízes não tratadas. A rugosidade superficial média das amostras antes e após exposição a cada tratamento foi determinada utilizando um rugosímetro. Além disso, o *S. sanguinis* foi cultivado sobre as amostras tratadas e não tratadas e as quantidades de bactérias retidas na superfície foram medidas pelo método de cultura. Todos os tratamentos aumentaram a rugosidade da superfície de dentina radicular, no entanto, o tratamento com curetas produziu superfícies mais ásperas quando comparado com o laser de Er: YAG e com o sistema de ultrassom. Além disso, durante a instrumentação, a ponta das curetas parece alcançar uma área mais ampla da superfície radicular do que as pontas de ultrassom e laser Er: YAG. A adesão dos *S. sanguinis* foi maior nas superfícies raspadas com curetas, o que pode ser explicado pela maior exposição dos túbulos dentinários em relação aos outros grupos uma vez que estes podem agir como reservatórios para recolonização bacteriana da bolsa periodontal após o debridamento.

Herrero et al. (2010) sabendo que os benefícios do uso do laser de Er:YAG como coadjuvante da terapia periodontal ainda não foram completamente determinados, desenvolveram um trabalho com o objetivo de avaliar a capacidade do laser de Er:YAG na eliminação de cálculo em dentes com superfícies radiculares periodontalmente afetadas, comparando com o ultrassom. Observaram também o dano causado à raiz a partir de ambos os tipos de instrumentação. Para isso, eles utilizaram 40 molares humanos extraídos por razões periodontais, divididos em 4 grupos. Uma raspagem com ultrassom piezoelétrico (Master EMS) com frequência de 28500Hz foi realizada na área direita da raiz dos dentes de todos os grupos. Dois tipos de laser de Er:YAG (KAVO Key II com 120 e 140mJ e KAVO Key III Plus Laser) equipado com um sistema de detecção de cálculo por fluorescência aplicado com 160mJ, sempre do lado esquerdo da raiz. Um grupo com o laser de Er:YAG com 120mJ, outro com 140mJ, um grupo de Laser de Er:YAG 160mJ sem sistema de feedback de detecção de cálculo e um com 160mJ com esse sistema. A quantidade de cálculo residual, o número e o diâmetro dos túbulos dentinários expostos foram calculados com microscopia eletrônica de varredura (MEV). Como resultados observaram que não foram identificadas diferenças quanto à quantidade de cálculo residual entre os quatro diferentes tratamentos. Com relação ao número de túbulos

dentinários expostos, a aplicação do laser sem o sistema de *feedback* produz uma maior exposição, quando comparados ao ultrassom. Puderam concluir que a capacidade do laser de Er:YAG para remover cálculo é comparável com da raspagem com ultrassom. Os novos lasers com sistema de *feedback* permitem uma remoção seletiva de cálculo sem causar qualquer modificação da superfície da raiz.

Akiyama et al. (2011) realizaram um estudo com o objetivo de investigar o efeito do laser de Er:YAG na morfologia das bactérias periodontopatogênicas e também para comparar o efeito do laser e do ultrassom na eliminação de bactérias em superfícies de raízes doentes *in vitro*. Colônias de *Porphyromonas gingivalis* foram expostas a irradiação de laser de Er:YAG, 40mJ/pulso e foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Além disso, 20 pares de superfícies radiculares de dentes recém-extraídos por motivos periodontais com cálculos subgengivais foram tratados por laser Er:YAG 40mJ/pulso e 10Hz com jato de água, outro grupo com ultrassom e um outro grupo não foi tratado. MEV e MET mostraram que o Er:YAG tinha facilmente removido a colônia de bactérias, deixando uma mancha de ablação com uma cratera aos arredores das áreas infectadas. A irradiação de laser foi tão eficiente e eficaz quanto o ultrassom na realização de debridamento da superfície radicular. As unidades formadoras de colônia, após o tratamento a laser, foram significativamente menores, do que após a aplicação de ultrassom, em condições aeróbias e anaeróbias. O laser de Er:YAG conseguiu remover as bactérias periodontopatogênicas com vaporização térmica, e o seu efeito de eliminação bacteriano sobre as raízes de dentes doentes parece ser superior ao do ultrassom.

O objetivo do estudo de Theodoro et al. (2010), foi de avaliar o efeito do laser de Er:YAG sobre a remoção de *smear layer* da superfície radicular de dentes humanos extraídos e comparar a sua eficácia com a do ácido cítrico, EDTA e um gel contendo uma mistura de tetraciclina ácida e ácido cítrico, utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV). 30 dentes humanos foram divididos aleatoriamente em 6 grupos. G1 (controle), G2 ácido cítrico 24%, G3 EDTA 24%, G4 ácido cítrico 50% e tetraciclina, G5 Er:YAG (47mJ/10Hz/5,8J/cm²/pulso) e G6 Er:YAG (83mJ/10Hz/10,3J/cm²/pulso). Foram observadas diferenças entre os grupos de Er:YAG e aqueles submetidos a outras modalidades de tratamento. Quando os dois grupos de Er:YAG foram comparados, o G6 foi estatisticamente mais eficaz na

remoção da camada de esfregaço do que o G5. As superfícies radiculares irradiadas pelo laser de Er:YAG tinham contornos mais irregulares do que aqueles tratados por agentes químicos. Pode-se concluir que todas as modalidades de tratamento foram eficazes na remoção de *smear layer*. Os resultados do estudo sugerem que o laser de Er:YAG pode ser utilizado com segurança para superfícies radiculares. Além disso, o efeito do Er:YAG na irradiação dessas superfícies deve ainda ser avaliada *in vivo*, para que seu potencial possa melhorar a cura dos tecidos periodontais.

2.2.2 Laser de Nd:YAG

Schultz et al. (1986) realizaram um estudo com o objetivo de explorar o possível papel do laser em ortopedia como auxiliar do tratamento de osteomielite crônica e para isso precisaram iniciar estudando *in vitro* os efeitos da energia do laser de Nd:YAG sobre três tipos de bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). As células de cada tipo foram divididas em quatro grupos. No grupo I elas foram expostas a laser com densidade de energia de 555 a 3333J/cm². Nos grupos II e III, dois corantes artificiais foram adicionados. O vermelho congo ou azul de metileno. O grupo IV foi dividido em dois subgrupos, IVa e IVb. No subgrupo IVa não foi utilizado laser e o IVb foi utilizado para medir os efeitos térmicos e bactericidas do laser. Chegaram a concluir que a utilização de baixas doses de energia do laser (1667J/cm²) resultaram em diminuição do número de colônias de bactérias *in vitro*. Quando comparam os tipos de bactérias estudadas, a *P. aeruginosa* foi a mais sensível ao laser de Nd:YAG e a *E. Coli* foi a mais resistente. A adição de um corante de cor escura também consegue aumentar significativamente os efeitos bactericidas do laser de Nd:YAG.

Chen et al. (2000) estudaram o efeito do laser de Nd:YAG sobre os fibroblastos gengivais humanos. A aplicação do laser de Nd:YAG foi realizada no modo pulsado em culturas primárias de FGH. Os parâmetros de utilização foram de 50 a 150mJ de energia, potência de 1 a 3W, taxa de repetição de 10 a 30pps e um tempo de aplicação de 10 segundos. As culturas celulares de fibroblastos gengivais humanos foram analisadas por exame citomorfológico utilizando contraste de fases e microscopia eletrônica de varredura. A vitalidade celular também foi avaliada

através do MTT. No MEV observaram-se danos celulares aos fibroblastos. As mudanças citomorfológicas variaram do desaparecimento da fronteira celular à perda de identificação do núcleo e à contração de células e vacuolização. Houve significativa diminuição da vitalidade celular (14% ~ 44%) quando a irradiação tinha contato, no entanto, quando se desfocava cerca de 2mm com as mesmas configurações de energia não houve diminuição da vitalidade celular. Os efeitos prejudiciais do laser de Nd:YAG nas células foram demonstrados neste estudo e ficou claro que para minimizar os efeitos prejudiciais, o laser de Nd:YAG pode ser utilizado com uma baixa dose de energia e pulsação correspondente, suficientes para o propósito clínico específico. Fornece ao cirurgião dentista o entendimento sobre os riscos da aplicação do laser no tratamento periodontal e que quando utilizado nos padrões corretos os danos aos tecidos moles adjacentes podem ser minimizados.

A eficácia do Nd:YAG associado com tratamento convencional para redução bacteriana foi investigada por Andrade et al. (2008). O objetivo deste estudo foi avaliar a redução bacteriana após a irradiação com laser de Nd:YAG associado com raspagem e alisamento radicular em defeitos de furca classe II em pacientes com periodontite crônica. Trinta e quatro lesões de furca foram selecionadas em 17 indivíduos. O grupo controle recebeu tratamento convencional e o grupo experimental recebeu o mesmo tratamento seguido de irradiação de laser de Nd:YAG (100mJ/pulso, 15Hz, 1,5W, 60s, 141,5J/cm²). Ambos os tratamentos resultaram em melhorias de parâmetro clínico. A redução significativa das unidades formadoras de colônia (UFC) e de número total de bactérias foi observada em ambos os grupos. A maior redução foi observada no grupo experimental imediatamente após o tratamento. O número de bactérias pigmentadas escuras e o percentual de pacientes com *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* reduzidos imediatamente após o tratamento, voltou para valores próximos dos iniciais 6 semanas após o *baseline* para ambos os grupos. O laser de Nd:YAG associado ao tratamento convencional promoveu redução bacteriana significativa em lesões de furca classe II imediatamente após a irradiação, embora esta redução não pudesse ser observada 6 semanas após o *baseline*.

O objetivo da pesquisa de Hamaoka et al. (2009) foi de comparar a biocompatibilidade *in vivo* de superfícies de raízes dentais submetidas a quatro diferentes tratamentos após avulsão dentária seguida de implante em tecido subcutâneo de ratos. Sabendo que o preparo da raiz dentária antes do reimplante de dentes continua sendo um desafio para endodontistas, talvez o uso da irradiação de Nd:YAG pudesse ser uma alternativa. 48 dentes humanos recém-extraídos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, antes da implantação em subcutâneo de ratos. Grupo 1 raiz seca, deixada no ambiente até 3h; grupo 2, o mesmo tratamento que o G1, seguido de imersão em uma solução 2,4% de fluoreto de sódio (pH 5,5); grupo 3, raiz embebida em soro fisiológico, após avulsão por 72h; grupo 4, o mesmo tratamento que G1, seguido de Nd:YAG (2,0W, 20Hz, 124,34 J/cm²). Os animais foram sacrificados 1, 7 e 45 dias depois. Exames histológicos e microscopia eletrônica de varredura foram feitos. Como resultados, obtiveram que todas as raízes foram envolvidas e tiveram íntimo contato com o tecido conjuntivo em várias espessuras. Foram observadas diferenças no grau de inflamação e na maturação do tecido conjuntivo. No G3 o infiltrado inflamatório foi mantido por 45 dias, enquanto que o G4, com Nd:YAG, teve respostas mais suaves. Os aspectos gerais das superfícies radiculares foram semelhantes, exceto pelas raízes irradiadas, onde houve a fusão e ressolidificação da superfície da raiz abrangendo os túbulos dentinários. Concluíram que o Nd:YAG melhora a biocompatibilidade da raiz dentária, tornando-se um tratamento alternativo antes da reimplantação.

Qadri et al. (2011) investigaram os efeitos a longo prazo de uma única aplicação de Nd:YAG em combinação com raspagem e alisamento radicular (RAR) para o tratamento de inflamação periodontal. Vinte e dois pacientes foram incluídos em um estudo cego randomizado de boca dividida. Os parâmetros do Nd:YAG foram 4W, 80mJ/pulso, 50Hz de 60 a 120s. O lado do teste foi tratado com uma única aplicação de laser Nd:YAG, enquanto que o lado controle foi tratado com raspagem e alisamento radicular. O estudo teve a duração de 20 meses e os padrões de doença periodontal inflamatória (índice de placa, índice gengival, profundidade de sondagem) e as margens ósseas (em radiografias bite-wing) foram medidos. O fluido gengival foi coletado nos dentes 35, 36, 45 e 46 no início e durante o estudo. O índice de placa, o índice gengival, e a profundidade de sondagem foram significativamente menores no lado teste quando comparado ao lado controle em

todo o acompanhamento. Os resultados radiológicos apresentaram perda óssea significativamente menor no lado teste, em comparação ao lado controle. Concluíram que uma única aplicação do laser de Nd:YAG em combinação com RAR teve um efeito positivo a longo prazo sobre a saúde periodontal comparado com o tratamento de RAR sozinho.

Sabendo que o objetivo da terapia periodontal regenerativa é a reconstituição das estruturas periodontais perdidas e que as proteínas de matriz do esmalte são utilizadas para auxiliar na regeneração, foi que Dilsiz et al. (2010), realizaram um estudo clínico de boca dividida com o objetivo de avaliar e comparar a cicatrização dos defeitos ósseos após tratamento com proteínas de matriz do esmalte com ou sem a irradiação na superfície radicular de um laser de Nd:YAG. Para isso, selecionaram aleatoriamente 42 defeitos infra ósseos em 21 pacientes com periodontite crônica para se submeterem a cirurgias com aplicação do laser de Nd:YAG (1W, 10Hz, 100mJ e 1064nm) associado a proteínas de matriz do esmalte, sendo este o grupo teste e no defeito do outro lado fizeram a cirurgia aplicando somente EDTA e proteínas de matriz do esmalte, sendo este o grupo controle. A avaliação clínica periodontal foi feita no início do tratamento, após 6 meses e 12 meses de tratamento. Os defeitos tratados com os dois tipos de tratamento tiveram melhoras significantes com relação à diminuição da profundidade de sondagem e o ganho no nível de inserção clínica, porém o grupo controle teve reduções maiores na profundidade de sondagem e ganho maior do nível de inserção clínica. Sendo assim, chegaram a conclusão de que ambos os tratamentos conseguiram melhorar parâmetros clínicos, mas que o laser de Nd:YAG não conseguiu ser melhor do que o EDTA combinado com as proteínas de matriz de esmalte.

Slot et al. (2011), realizaram uma pesquisa com o objetivo de testar o uso de Nd:YAG como adjuvante no debridamento manual subgengival e com instrumentos ultrassônicos e na redução do número de microorganismos. Este estudo clínico foi um ensaio cego, randomizado e controlado de boca dividida. Dezenove indivíduos com periodontite generalizada de moderada a grave foram selecionados. Todas as bolsas $\geq 4\text{mm}$ foram tratadas com o laser de Nd:YAG (1064nm, 6W, 400 mJ). As avaliações clínicas (índice de placa, sangramento em sondagem e profundidade de sondagem), foram realizados antes e 3 meses após o tratamento. Em cada quadrante, uma amostra foi tirada para avaliação microbiológica antes do

tratamento, imediatamente após a instrumentação e 3 meses após o tratamento. Na visita de 3 meses, os parâmetros clínicos tinham melhorado significativamente para ambos os tratamentos. Não houve diferenças significantes entre os tratamentos em qualquer momento. Imediatamente após a instrumentação, o total de unidades formadoras de colônia para ambos os grupos foi significativamente reduzido, quando comparado com instrumentação inicial. Três meses após o início do tratamento não houve melhora significativa com o uso adicional do laser de Nd:YAG. Os achados microbiológicos concordam e refletem esses achados clínicos.

2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

Talvez o uso indiscriminado de antibióticos esteja começando a causar certa resistência dos microorganismos aos antibióticos existentes. Provavelmente essa resistência tenha vindo reativar os estudos acerca dos tratamentos com terapia fotodinâmica, termo concedido por Tappeiner, em 1904, à terapia que se baseia no conceito de que um corante, com preferência pelas bactérias e não por tecidos circundantes ou células, fotossensibilizado por baixas doses de luz visível de um comprimento de onda apropriado gere radicais de oxigênio livres, que são tóxicos para os microorganismos alvo (MAISCH, 2007).

Com o objetivo de investigar se bactérias em amostras de placa subgengival de pacientes com periodontite crônica podem ser sensibilizadas pelo corante azul de toluidina O, foi que Sarkar e Wilson (1993), desenvolveram um trabalho. No desenvolvimento do estudo, utilizaram 20 amostras de placa subgengival de pacientes com periodontite crônica que foram expostas a um laser de HeNe com 7,3mW por 30 segundos, na presença e na ausência de 50µg/ml de corante fotossensibilizador de azul de toluidina O. Foram realizadas contagens de vários grupos de espécies de bactérias antes e depois da irradiação, entre elas aeróbias, anaeróbias, anaeróbias pigmentadas de preto, *Porphyromonas gingivalis*, *Eubacterium nucleatum* e estreptococos. Quando o laser foi utilizado juntamente com o corante, houve reduções significantes nessas bactérias. Já somente a aplicação do corante não conseguiu reduzir significativamente a viabilidade das bactérias, no entanto, em uma pequena minoria das amostras que foram somente

irradiadas com o laser pôde-se observar morte das bactérias mesmo sem a indução de toxicidade de um corante. A possibilidade de utilizar lasers em baixa intensidade, associados a agentes fotossensibilizadores apropriados, como um complemento da raspagem mecânica, pode ser de grande utilidade no tratamento de doenças inflamatórias periodontais, porque se pode conseguir uma eficácia semelhante contra as bactérias da placa subgengival *in vivo*.

Com o objetivo de investigar os efeitos da terapia fotodinâmica sobre células epiteliais e fibroblastos gengivais humanos e de encontrar uma alternativa terapêutica para matar bactérias periodontopatogênicas sem danificar os tecidos normais adjacentes foi que Soukos et al. (1996) utilizaram um ensaio de proliferação celular *in vitro* (teste ELISA – a absorbância é diretamente proporcional ao número de células vivas na cultura) para a avaliação da viabilidade dos fibroblastos gengivais humanos e de queratinócitos quando tratados com um laser associado a um corante de azul de toluidina O. O estudo mostrou que após a exposição de 2 µg/ml e de 5 µg/ml de azul de toluidina O em queratinócitos e fibroblastos, respectivamente, não houve alteração na viabilidade dessas células mesmo associadas à exposição de HeNe por até 2 minutos (0,876J). Contudo, a morte de *Streptococcus sanguinis* foi obtida após uma irradiação de laser de HeNe durante 75 segundos (0,547J) na presença de azul de toluidina O (2,5µg/ml). Desta forma, pôde-se concluir que a fotossensibilização letal desse microorganismo pode ser possível em concentrações e num tempo que não afete a viabilidade dos queratinócitos e dos fibroblastos gengivais humanos, encorajando o desenvolvimento de um protocolo eficaz para o controle de doenças relacionadas à placa bacteriana.

Chan e Lai (2003) realizaram um estudo com o objetivo de tentar esclarecer se os efeitos bactericidas da terapia fotodinâmica (PDT) são dependentes do comprimento de onda ou da dosagem do laser. O outro objetivo do estudo foi de criar um protocolo que pudesse ser utilizado para eliminação de patógenos periodontais. Para isso, utilizaram um laser de HeNe (632,8nm) com 30mW de potência, um laser de diodo com 100mW e 665nm ou um laser de diodo com 100mW e 830nm, na ausência ou na presença de azul de metileno como agente fotossensibilizador, em culturas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e

Streptococcus sanguis. Um grupo controle negativo sem tratamento algum, um grupo somente com laser e um grupo somente com corante azul de metileno foram adicionados. As culturas foram analisadas pela contagem de células viáveis. Os resultados indicaram que somente a exposição ao laser de 100mW poderia eliminar em média 40% das bactérias. Mas a eficácia da combinação do laser com o agente fotossensibilizante conseguiu ser maior. Os resultados de estudos indicaram que a melhor resposta a PDT foi com uma densidade de energia de $21,2 \text{ J/cm}^2$ com 60s de exposição e com 665nm do laser de diodo. Nesta condição, quase todas as bactérias foram eliminadas. Estes resultados mostraram que tanto o comprimento de onda quanto a densidade de energia são fatores importantes e que um laser de baixa intensidade em combinação com um fotossensibilizador é um excelente agente bactericida. Concluíram que a utilização de um laser de diodo com potência e comprimento de onda adequados e que 60s de irradiação poderiam ser um adjuvante útil à raspagem mecânica na prevenção da recolonização de lesões subgengivais por microorganismos patogênicos.

Qin et al. (2008) realizaram um estudo com o objetivo de investigar a fotossensibilização de bactérias periodontais em ratos (com doença periodontal estimulada, simulando uma situação *in vivo*) e comparar com a eficácia do tratamento de rotina (raspagem e alisamento radicular). Para isso, tiveram que desenvolver periodontite nos primeiros molares superiores, em ambos os lados, de 16 ratos com a colocação de elásticos ortodônticos na região subgengival. Depois de 6 semanas, os locais de infecção foram tratados com 1mg/ml de azul de toluidina e irradiação de um laser vermelho com 12 J/cm^2 , ou com raspagem e alisamento radicular. A avaliação das duas terapias foi realizada através da redução total da flora bacteriana e das alterações histológicas dos tecidos periodontais. Em ambos os tratamentos houve uma redução significativa das bactérias. Os sinais de inflamação que normalmente acompanham a periodontite, como vermelhidão, aumento do índice de placa e gengival, o sangramento à sondagem e a infiltração de células inflamatórias, foram bastante reduzidos, sem danos aos tecidos adjacentes. Concluiu-se que a terapia fotodinâmica associada ao azul de toluidina pode tratar periodontite efetivamente e tem alto potencial para ser aplicada clinicamente.

Em um estudo *in vitro* anterior a este, os pesquisadores puderam observar que o azul de toluidina se mostrou um excelente agente fotossensibilizador de

patógenos periodontais em pacientes com doença periodontal. Foi com esta conclusão que Luan et al. (2009) realizaram um estudo com o objetivo de investigar se a fotossensibilização com azul de toluidina poder exercer efeitos prejudiciais sobre os tecidos periodontais em ratos. Para a realização do estudo, eles utilizaram 24 ratos que foram divididos aleatoriamente em 4 grupos. Um grupo experimental de terapia fotodinâmica os ratos foram tratados com 1mg/ml de azul de toluidina e irradiação com $60\text{J}/\text{cm}^2$, 635nm, 377segundos. O grupo controle foi dividido em 3, os ratos do controle 1 foram submetidos a $140\text{J}/\text{cm}^2$ de irradiação de laser por 660 segundos somente, o controle 2 foram tratados com 2,5mg/ml de azul de toluidina sozinho e o controle 3 não recebeu nenhum dos tratamentos. Depois de 72h todos os ratos foram mortos e foram colhidas amostras do tecido periodontal para exame histológico. Não puderam ser observadas qualquer alteração necrótica ou inflamatória na gengiva, dentina, polpa dentária ou osso alveolar dos ratos em todos os grupos. Os resultados vieram a sugerir que a PDT associada ao azul de toluidina é considerada segura para o tratamento de periodontopatógenos sem causar efeitos prejudiciais para os tecidos normais adjacentes.

O objetivo do estudo de Fernandes et al. (2010), foi de fazer uma avaliação radiográfica do efeito da terapia fotodinâmica como um complemento da raspagem e alisamento radicular em ratos com periodontite induzida, imunossuprimidos ou não com dexametasona. Os animais foram divididos em dois grupos, um grupo (ND) com 60 animais tratados somente com solução salina e outro grupo (D) também com 60 animais tratados com dexametasona. Um ligadura foi colocada nos primeiros molares inferiores esquerdos dos ratos para induzir a periodontite e após 7 dias esse elástico foi removido e os molares em questão foram raspados. Os animais foram novamente divididos, agora em subgrupos de acordo com os tratamentos, com 30 animais por subgrupo. Um grupo com raspagem e alisamento radicular e irrigação com 1ml de solução salina e outro de terapia fotodinâmica com um corante azul de toluidina e irradiação de um laser de baixa intensidade (GaAlAs). Dez animais por grupo de tratamento foram mortos nos períodos de 7, 15 e 30 dias. Utilizaram a radiografia para medir a distância entre a junção cimento esmalte e a altura da crista alveolar na superfície mesial do primeiro molar inferior esquerdo. A avaliação radiográfica intragrupo mostrou que houve perda óssea significativamente menor nos animais tratados com PDT em todos os períodos experimentais do que aqueles

somente submetidos à raspagem e alisamento radicular. Já na análise intergrupo houve uma maior perda de osso no grupo sem dexametasona com raspagem, quando comparado ao grupo com dexametasona tratado com PDT em 7 e 30 dias. A partir desses resultados, puderam concluir que a terapia fotodinâmica é um eficiente adjuvante ao tratamento de raspagem e alisamento radicular em periodontite induzida em ratos imunossuprimidos com dexametasona.

Rühling et al. (2010) investigaram, se à curto prazo, a aplicação de uma única sessão de terapia fotodinâmica teria a capacidade de reduzir a profundidade de sondagem em bolsas periodontais persistentes e se conseguiria alterar a composição microbiana para uma flora considerada saudável, diminuindo a quantidade total de bactérias subgengivais, quando comparadas a aplicação de uma terapia convencional de raspagem com ultrassom, em pacientes que já se encontravam em terapia de manutenção de bolsa. Pacientes com periodontite crônica com pelo menos 2 bolsas e uma delas sendo > 4mm foram incluídos na pesquisa e foram divididos em 2 grupos. Desta forma, 29 indivíduos foram tratados com ultrassom e 25 com terapia fotodinâmica (30s de aplicação do fotossensibilizador e 1min de aplicação do laser com 10mW de potência). Foram realizados exames clínicos e microbiológicos no início do tratamento e após 3 meses. Os resultados obtidos para a profundidade de sondagem não tiveram diferenças significantes entre os dois tratamentos realizados, sendo que no grupo de ultrassom houve diminuição de 5,3mm para 4,5mm e no grupo de PDT de 5,3mm para 4,7mm. As contagens microbianas tiveram uma redução logo após o tratamento (30%-40%), mas após o terceiro mês retornaram aos valores do *baseline*. Os resultados clínicos observados não podem demonstrar uma conclusão definitiva, mas apesar do tratamento com PDT não ter sido superior ao tratamento com ultrassom ela deve ser considerada uma alternativa terapêutica interessante.

2.4 CÉLULAS DE GRANULAÇÃO ÓSSEA

Passanezi et al. (1989) realizaram um estudo com o objetivo de testar a eficácia de uma técnica de enxerto desenvolvida tomando como base que osso imaturo contém células indiferenciadas em abundância e que estas células podem

ter potencial osteogênico. Foram apresentadas evidências clínicas e histológicas em cães e seres humanos da eficácia dessa técnica com osso imaturo. Esta técnica consistia na criação de um defeito ósseo em uma área edêntula e posterior remoção do tecido de granulação desta área para a colocação no defeito periodontal. A coleta foi feita 3 a 4 semanas depois da cirurgia em humanos e 12 dias após, em cães. O osso recém-formado pode ser usado com sucesso como um material de enxerto. E essa granulação óssea formada tem bom potencial osteogênico sem causar reabsorção radicular ou anquilose. Inibe também o crescimento epitelial no enxerto e favorece a formação de novo ligamento periodontal. O sucesso clínico deste procedimento é suportado pelo sucesso histológico encontrado em cães.

Penteado et al. (2005) com o objetivo de analisar a natureza e a atividade proliferativa de células presentes em tecido ósseo recém-formado a partir de alvéolos de extração, realizaram um estudo piloto em 6 pares de alvéolos humanos cobertos ou não por uma membrana de e-PTFE. O tecido neo-formado foi coletado 4 semanas após a extração do dente foram analisados através de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foi feita a caracterização imunohistoquímica de colágeno tipo I, osteonectina e a detecção da sialoproteína óssea. A taxa de proliferação dos tecidos foi obtida utilizando PCNA. Foi observado que as células de tecido de cicatrização de alvéolos dentários são de natureza osteoblástica. Além disso, eles apresentam maior taxa de proliferação nas áreas coronais independente do uso de membranas de e-PTFE.

O objetivo do estudo de Barbosa (2012) foi de estabelecer uma cultura primária de células derivadas da granulação óssea de seres humanos para determinar seu padrão de crescimento *in vitro*. Foram coletadas amostras de tecido ósseo provenientes de alvéolos de cicatrização criados 21 dias antes em 4 pacientes. Foi feita a curva de crescimento dessas células por meio do teste de MTT, para identificação da atividade mitocondrial, nos períodos de 1, 3, 5, 7 e 10 dias de plaqueamento. Os resultados da curva de crescimento mostraram que as células de granulação óssea tiveram um crescimento progressivo até o 10º dia. Houve aumento significativo ($p < 0.05$) do número de células vitais presentes na cultura nos dias 3 (90,8%), 5 (132,50%), 7 (137,50%) e 10 (227,50%) em relação ao controle (dia 0). Esses achados sugerem que as células apresentam alta atividade de proliferação e síntese, sendo compatíveis com células de linhagem osteoblástica.

Os relatos de caso apresentados por Sant'Ana et al. (2012) tiveram o objetivo de apresentar uma técnica que pode ser proposta para a cobertura radicular em sítios onde hajam recessões profundas e perda de inserção clínica. Foi feito o relato de casos em 4 pacientes que tinham recessão profunda em áreas vestibulares e foram tratadas pela técnica de formação de granulação óssea, que consiste na criação de um alvéolo em uma região desdentada e a posterior transferência deste tecido de granulação formado após 21 dias para a área do defeito. Os parâmetros clínicos periodontais foram medidos (profundidade de recessão, profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, sangramento à sondagem, índice de placa e largura de gengiva ceratinizada) por um único examinador antes da cirurgia, 1, 3, 6 e 9 meses depois. Em todos os casos pôde-se observar uma redução na profundidade de sondagem e na recessão acompanhado do ganho do nível de inserção clínica, mas nenhum aumento na faixa de gengiva ceratinizada pôde ser observado. Esta técnica associada ao recobrimento radicular pode favorecer a regeneração periodontal, principalmente em áreas de recessões profundas e perda de inserção.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo comparar os efeitos de raízes humanas tratadas por diferentes técnicas como: laser (Terapia fotodinâmica, Er:YAG, Nd:YAG), tratamentos convencionais como a raspagem e alisamento radicular e o uso de ácido cítrico + tetraciclina, na proliferação de fibroblastos gengivais humanos e células de granulação óssea.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP) com o número de processo 086/2011 (Anexo A).

4.1 SELEÇÃO DOS DENTES

Foram selecionados 25 dentes permanentes humanos (incisivos centrais e laterais, caninos, pré-molares e molares), condenados por razões periodontais. Estes dentes, após a extração, foram armazenados em recipiente contendo 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 para mantê-los. Os pacientes assinaram um termo de doação espontânea de dentes (Anexo B).

4.2 PREPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS

Foram preparados fragmentos dos dentes com dimensões padronizadas de aproximadamente 4mm de comprimento, 2mm de largura e 2mm de espessura. Essas amostras foram derivadas de áreas contaminadas, com superfície plana, sem a presença de sulcos ou depressões anatômicas. Os dentes foram então seccionados com um disco diamantado cerca de 2mm apicalmente à junção cimento esmalte. Este corte, perpendicular ao longo eixo do dente, separou a porção coronária da porção radicular. Um segundo corte, paralelo ao primeiro foi realizado 2mm apicalmente, permitindo a obtenção de uma “fatia” de dente que ainda foi seccionada paralelamente ao longo eixo do dente em 2 partes, o que possibilitou a obtenção de 2 fragmentos por dente. Todas as dimensões dos fragmentos foram mensuradas com auxílio de um espécímetro (Figura 5 A e B).

Figura 5 - A: Esquema da confecção dos espécimes; **B:** Fotografia de uma amostra com dimensões

No total foram confeccionados 45 fragmentos que após passarem por raspagem e alisamento radicular foram armazenados em frascos contendo soro fisiológico estéril e mantidos em geladeira até o início do experimento. Os fragmentos foram todos esterilizados em autoclave antes dos testes experimentais e da cultura de células a fim de evitar qualquer possibilidade de contaminação das amostras.

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos experimentais foram divididos em seis:

- CC grupo controle contendo apenas células;
- CD grupo controle de fragmentos de raiz raspados com curetas;
- ER grupo de fragmentos tratados com laser Er:YAG;
- ND grupo de fragmentos tratados com laser Nd:YAG;

PDT grupo de fragmentos tratados com terapia fotodinâmica – Azul de toluidina O + Laser InGaAlP;

AC grupo de fragmentos tratados ácido cítrico pH1 + Tetraciclina.

Foram utilizados 6 fragmentos em cada grupo experimental de tratamento e foram divididos em:

Grupo CC – controle + - somente células. Durante o plaqueamento nas placas de 96 poços, este grupo foi incluído para observarmos o crescimento das células FGH e GO com meio DMEM sem condicionamento.

Grupo CD – controle - 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 (Figura 6).

Grupo ER – A superfície de todo o fragmento foi irradiada com laser de Er:YAG (FOTONA, modelo Twinlight, Eslovênia), na forma de varredura, com 60mJ e taxa de repetição de 10 pulsos por segundo, sendo feita uma varredura completa na superfície da amostra. Com uma distância focal de 12mm e uso de jato de água e ar (Instituto de Física de São Carlos- IFSC-USP). Em seguida os fragmentos foram irrigados, durante 30 segundos, com soro fisiológico (Figura 7) (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros do Laser de Er:YAG

Potência	Distância Focal	Energia	Frequência	Taxa de Repetição	Tempo	Comprimento de onda
———	12mm	60mJ/pulso	10Hz	10pps	10 s	2940nm

Grupo ND – A superfície de todo o fragmento foi irradiada com laser de Nd:YAG (FOTONA, modelo Twinlight, Eslovênia) (Instituto de Física de São Carlos- IFSC-USP), na forma de varredura com 0,5W de potência, e frequência de 15Hz, sendo feita uma varredura completa em cada amostra. Em seguida os fragmentos foram irrigados, durante 30 segundos, com soro fisiológico (Figura 8) (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros do Laser de Nd:YAG

Potência	Distância Focal	Energia	Frequência	Taxa de Repetição	Tempo	Comprimento de onda
0,5W	Contato	_____	15Hz	_____	10s	1640nm

Grupo PDT – Os fragmentos foram mergulhado em Azul de Toluidina O por 60s e irradiados com laser InGaAlP (Thera Lase® - D.M.C. Equipamentos Ltda, São Carlos/ Brasil) (FOB - Processo Fapesp nº10/15667-2), 660nm, 30mW, 45J/cm², modo contínuo, depois foram apreendidos por uma pinça para serem irradiados por varredura por 30s nos sentidos vertical, horizontal e diagonal, sendo 10 segundos em cada direção. Em seguida os fragmentos foram irrigados, durante 30 segundos, com soro fisiológico (Figura 9) (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros do Laser de InGaAlP

Potência	Distância Focal	Densidade de Energia	Diâmetro da ponta	Tempo	Comprimento de onda
30mW	≤1mm	45J/cm²	1mm	30s	660nm

Grupo AC – Os fragmentos foram submetidos a esfregaço com pincéis de *microbrush* com ácido cítrico pH1 + tetraciclina (solução de ácido cítrico pH 1.0 a 50% e tetraciclina a 10% - Farmácia de manipulação Bauru Fórmulas, Bauru-SP) por minutos. Em seguida foram irrigados, durante 30 segundos, com soro fisiológico (Figura 10).

Depois de realizados os tratamentos, os espécimes já tratados foram armazenados em frascos estéreis e levados novamente para esterilização para a realização da cultura de células.

Figura 6 - Raspagem e alisamento radicular de um dos fragmentos

Figura 7 - Aplicação do Laser de Er:YAG

Figura 8 - Aplicação do Laser de Nd:YAG

Figura 9 - Aplicação da Terapia fotodinâmica

Figura 10 - Aplicação do Ácido Cítrico + Tetraciclina

4.4 CULTURA DE CÉLULAS

Para este estudo foram utilizados fibroblastos gengivais humanos da linhagem celular FGH estabelecida por cultura primária a partir de um fragmento de gengiva humana (OHIRA, 2012). Também foram utilizadas células de granulação óssea da linhagem GO obtidas por cultura primária a partir de um alvéolo com 28 dias de cicatrização (BARBOSA, 2012). As células foram cultivadas em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco¹ contendo 10% de soro fetal bovino² e 1% de solução antibiótica³ e 0,5% de solução antifúngica³. As células foram incubadas em ambiente úmido, a 37°C, numa atmosfera contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (Figura 11).

Figura 11 - Esquema para a cultura de células (FGH e GO). As células FGH e GO foram cultivadas em garrafas de cultura celular com meio de cultura Eagle modificado por Dubelco, mantidas em estufa a uma temperatura de 37°C

Para o experimento de proliferação celular, foram plaqueadas 2×10^3 células/poço, na 6ª passagem, numa placa de 96 poços (Figura 12).

¹ DME, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA

² Cultilab, Campinas, SP, Brasil

³ Sigma Chemical Co, StLouis, MO, EUA

Figura 12 - Placa de 96 poços onde a primeira metade foi plaqueada com fibroblastos gengivais (FGH) e a segunda metade com células de granulação óssea (GO). Grupos experimentais em sextuplicata. CC = controle positivo somente células, CD= controle raspagem, ER = Er:YAG, ND= Nd:YAG, PDT = terapia fotodinâmica, AC = ácido cítrico, BK = blank

O meio de cultura de cada grupo experimental foi condicionado, ficando em contato com os fragmentos tratados, por 24h em estufa de cultivo celular. Após 24h do plaqueamento, o meio convencional foi substituído pelos meios condicionados, com exceção do grupo controle positivo (CC), que recebeu meio DMEM convencional (Figura 13 A, B, C e D).

A proliferação celular foi avaliada nos períodos de 24, 48, 72 e 96h pelo teste da análise da atividade mitocondrial das células, método da redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazólio) (MOSSMAN, 1983). Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e, então, sua concentração é determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 562nm (Figura 14, Figura 15 e Figura 16).

Figura 13 - **A:** Tubos Falcon com meio DMEM sendo condicionado com os fragmentos de raiz tratados; **B:** Meio sendo condicionado na estufa; **C:** Fragmentos condicionando o meio e **D:** Placa de 96 poços com o meio condicionado

Figura 14 - Cristais de formazan no interior das células

Figura 15 - A: Placa de 24 horas para MTT; B: Placa de 48 horas para MTT; C: Placa de 72 horas para MTT; D: Placa de 96 horas para MTT

Figura 16 - Espectrofotômetro (Laboratório de Bioquímica da FOB/USP)

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente, com o programa Statistica 11.0 (www.statsoft.com/company), através do teste de análise de variância a 3 critérios (ANOVA) complementado pelo teste de Tukey. O teste de normalidade não foi necessário, tendo em vista que não existe nenhum teste não paramétrico que seja tão sensível quanto o ANOVA 3 critérios. O nível de significância adota foi de 5% ($p < 0,05$).

5 Resultados

5 RESULTADOS

Os resultados do experimento comparando os tipos celulares, tempos e diferentes grupos experimentais, estão em uma tabela no Apêndice A. Como é uma tabela complexa, vamos descrever os resultados por tópicos e na forma de gráficos separados e com linhas de cor mais escura para as células FGH e linhas de cor mais clara para as de GO.

5.1 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLES

Nesse tópico, levamos em consideração a comparação entre grupos experimentais (CC e CD) e tipos celulares (FGH e GO) em cada período de tempo. Comparações entre os diferentes períodos de tempo não foram consideradas para facilitar o entendimento.

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos controle (somente de células-CC e fragmento de dente raspado -CD) para ambos os tipos celulares ($p>0,05$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Análise entre os grupos Controle de Células (CC) e Controle de Dentes (CD). ($p>0,05$)

5.2 COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS (LASERS E ÁCIDO) EM RELAÇÃO AO CONTROLE (CÉLULAS)

Nesse tópico, levamos em consideração a comparação entre grupos experimentais (ER, ND, PDT, AC) separadamente com o controle de células (CC) apenas, uma vez que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os controles (CC e CD). As comparações também serão feitas em cada período isoladamente. Comparações entre os diferentes períodos de tempo não foram consideradas para facilitar o entendimento.

Em relação ao grupo laser Er:YAG, pode-se observar que não houve diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle, nem para as células FGH, nem para as GO ($p>0,05$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Análise entre o Controle (CC) e o Er:YAG (ER). ($p>0,05$)

Já em relação ao grupo Nd:YAG, apenas no período de 72h, houve diferenças estatisticamente significantes em relação aos controles para ambos os tipos celulares ($p<0,05$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Análise entre os grupos Controle (CC) e Nd:YAG (ND). Letras diferentes = $p < 0,05$

Para o grupo PDT, foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle, nos períodos de 48h e 72h, apenas para o grupo de células FGH ($p < 0,05$) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Análise entre os grupos Controle (CC) e Terapia fotodinâmica (PDT). Letras diferentes = $p < 0,05$

Para o grupo do ácido cítrico, houve diferenças estatisticamente significantes nos períodos de 72h e 96h apenas para as células FGH ($p < 0,05$) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Análise entre os grupos Controle (CC) e Ácido Cítrico (AC). Letras diferentes = $p < 0,05$

Em resumo, observando o comportamento das células FGH e GO, após 24 horas, não houve diferença significativa entre os controles e os grupos experimentais, o que permaneceu até 48 horas no GO e se repetiu após 96 horas somente para o GO ($p > 0,05$) (Gráficos 2, 3, 4 e 5).

Ao se observar o comportamento das células FGH separadamente, foram encontradas diferenças significantes, após 48 horas, entre CC (DO = 0,129) e PDT (DO = 0,454), sendo que houve maior crescimento celular no PDT ($p < 0,05$). No período de 72 horas as diferenças estatísticas foram encontradas em todos os grupos experimentais menos no ER. Sendo o PDT (DO = 0,623), AC (DO = 0,520) e o ND (DO = 0,809) melhores que o CC (DO = 0,246) ($p < 0,05$). Após 96 horas, o grupo do AC (DO = 0,689) teve maior crescimento que o CC (DO = 0,274) ($p < 0,05$) (Gráficos 2, 3, 4 e 5).

Ao se observar o comportamento das células GO separadamente, nos períodos de 24, 48 e 96 horas não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$). Houve diferenças somente no período de 72 horas no grupo ND (DO = 0,508) em relação ao CC (DO = 0,217), tendo o ND produzido maior crescimento celular ($p < 0,05$) (Gráfico 3).

5.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS EXPERIMENTAIS (LASERS E ÁCIDO)

Achamos interessante, fazer uma comparação entre grupos experimentais, sem relacioná-los ao controle para ambos os tipos celulares separadamente. Novamente, comparações entre os diferentes períodos de tempo não foram consideradas, para facilitar o entendimento.

Com relação ao FGH, após 24 horas, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais de lasers ($p > 0,05$). Após 48 horas, apareceram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de ER (DO = 0,138) e o PDT (DO = 0,454), sendo que o PDT teve maior proliferação celular ($p < 0,05$). Também houve diferenças entre os grupos de PDT (DO = 0,454) e o ND (DO = 0,125), sendo o PDT que obteve maior proliferação celular ($p < 0,05$) (Gráfico 6).

Quando observado o período de 72 horas, as diferenças significantes apareceram para o ND (DO = 0,809), que teve maior proliferação celular do que o ER (DO = 0,560) e AC (DO = 0,520) ($p < 0,05$). Após 96 horas não houve diferenças significantes entre os grupos ($p > 0,05$) (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Análise de FGH entre os grupos experimentais. Letras diferentes = $p < 0,05$

No que diz respeito às células GO, após os períodos experimentais de 24 e 48 horas não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos experimentais, o que se repetiu no período de 96 horas ($p>0,05$). No período de 72 horas, apareceram diferenças significantes entre o ND ($DO = 0,508$) quando comparado com ER ($DO = 0,189$), PDT ($DO = 0,149$) e AC ($DO = 0,193$) sendo que o ND apresentou sempre mais proliferação celular ($p<0,05$) (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Análise de GO entre os grupos experimentais. Letras diferentes = $p<0,05$

5.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS TIPOS DE CÉLULAS (GO E FGH)

Como a taxa de crescimento dos dois tipos celulares é diferente, para ver o real efeito do tratamento em ambas, foi necessário transformar os valores de densidade óptica em porcentagem, considerando-se o período de 24h como 100% (Apêndice B).

Para as células GO, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e períodos ($p>0,05$) (Gráfico 8).

Para as células FGH, houve diferenças estatisticamente significantes dentro do grupo ER nos períodos 24h (100%) e 48h (960%) em relação aos períodos de 72h (3,905%) e 96h (3,316%) ($p<0,05$). No período de 72h a porcentagem de

crescimento no grupo ER (3,905%) foi significativamente maior que os grupos ND (1,009%), PDT (1,019%) e AC (562%) ($p<0,05$) (Gráfico 8). No período de 96h a porcentagem de crescimento no grupo ER (3,316%) foi significativamente maior que os grupos ND (625%), PDT (786%) e AC (745%) ($p<0,05$) (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Porcentagem de crescimento entre os grupos experimentais, considerando-se o período de 24 horas como 100%. Letras diferentes = $p<0,05$

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho pudemos observar que raízes tratadas com Nd:YAG promoveram um aumento significativo da proliferação das células GO em relação ao controle no período de 72h. Já para as células FGH, as raízes tratadas com PDT promoveram maior proliferação nos períodos de 48 e 72h, as tratadas com Nd:YAG apenas no período de 72h, e as tratadas com ácido cítrico, nos períodos de 72 e 96h.

Na comparação entre os grupos experimentais, para células FGH, após 48 horas, as diferenças foram significantes, tendo o PDT ocasionado maior proliferação celular do que o ER e ND ($p < 0,05$). Já no período de 72 horas o ND foi melhor que o AC e ER ($p < 0,05$). E essas diferenças não foram mais observadas após 96 horas, tendo somente o AC mantido um crescimento progressivo apesar de não ter sido estatisticamente significativo ($p > 0,05$). Com relação às células GO, houve diferenças estatisticamente significantes somente em 72 horas, sendo o ND melhor do que o ER, PDT e AC, e essas diferenças não permaneceram significantes após 96 horas de experimento.

Na comparação entre os tipos celulares, foi necessário transformar os valores de densidade óptica em porcentagem de crescimento, considerando-se o período de 24h como 100%. Do contrário, as células FGH teriam sempre um maior valor que as GO devido às diferenças de velocidade de crescimento entre elas. Foi possível observar um efeito significativo do Er:YAG sobre o crescimento das células FGH, principalmente nos períodos de 72h e 96h, quando comparado aos outros grupos.

A metodologia aplicada neste trabalho com o condicionamento dos meios de cultura pelos fragmentos tratados, se justifica pelas normas estabelecidas pelo ISO standard 10993-12 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARTIZATION, 1996), que definem que em um procedimento de extração de um material, é comum incubar este dispositivo ou material em um tubo de ensaio a 37°C durante 24 horas (CAVALCANTI; RODE; MARQUES, 2005; TAKAMORI et al., 2007).

Os parâmetros dos lasers utilizados nesta pesquisa foram todos baseados na literatura revisada ou no parâmetro pré-estabelecido pela instituição de onde o laser foi utilizado (FOB/USP e IFSC/USP).

O laser de InGaAlP (modo contínuo, 660nm, 30mW e 45J/cm², durante 30 segundos) foi utilizado seguindo os parâmetros utilizados no estudo de Salmeron et al. (2013) onde foram encontrados resultados positivos da utilização dele associado ao corante azul de Toluidina O (terapia fotodinâmica).

O aparelho de laser de Er:YAG e Nd:YAG empregado, foi do Instituto de Física de São Carlos – IFSC/USP) e consiste de um aparelho com os dois tipos de laser. O de Er:YAG seguiu parâmetros estabelecidos previamente pelos estudos de Feist et al. (2003) e Franco, Greghy e Assis (2005), que encontraram melhores resultados com 60mJ/pulso e 10Hz de frequência. O laser de Er:YAG de São Carlos fica fixo em um braço articulado e é padronizado que seja utilizado com uma distância focal de 12mm com spray de ar e/ou água, no caso, os dois. O laser de Er:YAG também não dá informação de potência em Watts, por isso esse parâmetro foi suprimido e o tempo de aplicação se limitou à uma varredura por amostra (cerca de 10 segundos), tendo em vista as especificações dadas pelo técnico que auxiliou o experimento. Já no de Nd:YAG, foi pré-estabelecida uma frequência de 15Hz (ANDRADE et al., 2008) e por causa das especificações do aparelho, para operar nesta frequência ele deveria atuar com 0,5W de potência, o tempo de aplicação também foi limitado à uma varredura por amostra (cerca de 10 segundos).

Com relação ao ácido cítrico, os padrões de utilização (pH1, 3 minutos de aplicação) já estão relatados na literatura desde o estudo de Register e Burdick (1975), e são utilizados há anos pelo nosso grupo de pesquisa.

A ausência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle devem ser provenientes de deficiências inerentes à técnica de cultura celular, que impõe a esterilização dos fragmentos radiculares após o tratamento, fazendo com que esses fragmentos de dentes somente raspados causem menos modificações ou até não causem modificações no meio de cultura condicionado.

A opção pelo teste estatístico ANOVA a três critérios se justifica pela necessidade de fazer a comparação considerando os parâmetros: tipo celular, tratamento e tempo. Poderíamos ter avaliado os tipos celulares de forma separada,

porém, levamos em consideração que um tratamento de biomodificação radicular pode atingir tanto células ósseas quanto células gengivais. E como pôde se observar nos resultados obtidos, houve diferenças estatisticamente significantes entre os tipos celulares para certos tipos de tratamento. As células FGH tiveram sempre um crescimento mais acelerado do que as células de GO, resultado também observado no estudo mais recente do nosso grupo, onde foi observado através da curva de crescimento que a partir de 48 horas o crescimento do FGH é estatisticamente maior que da GO (dados ainda não publicados). Tais resultados refletem os eventos clínicos onde a reparação do conjuntivo é muito mais rápida que a reparação óssea.

Discutir sobre laser é uma tarefa difícil, uma vez que os parâmetros utilizados divergem muito entre as pesquisas. Um exemplo disso pode ser observado no Apêndice C, onde fizemos uma tabela mostrando os parâmetros utilizados em cada artigo separadamente.

Em relação ao laser de Er:YAG, quando comparado ao controle, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) com relação a viabilidade celular medida pelo teste do MTT, tanto para FGH, quanto para GO. Resultados semelhantes, foram encontrados no trabalho de Theodoro et al. (2006), onde não houve estímulo, nem inibição na adesão de células sanguíneas sobre superfícies radiculares tratadas com o laser de Er:YAG. Porém quando avaliamos o crescimento celular em forma de porcentagem, o Er:YAG promoveu um aumento significativo na proliferação das células FGH nos períodos de 72h e 96h. Levando em consideração esse resultado, nossos dados estão de acordo com a literatura onde na maioria das vezes os resultados com esse laser são positivos (FEIST et al., 2003; FRANCO; GREGHI; ASSIS, 2005; GASPIRC; SKALERIC, 2007; AKIYAMA et al., 2011).

O laser de Nd:YAG promoveu um aumento significativo na proliferação de GO e de FGH no período de 72 horas, quando comparado ao grupo controle. Este resultado positivo encontrado ter ocorrido devido aos parâmetros (0,5W e 15Hz) de aplicação do laser de Nd:YAG nas superfícies radiculares, concordando com conclusões obtidas em outros estudos de proliferação celular ou de remoção de bactéria com a utilização do mesmo laser (SCHULTZ et al., 1986; CHEN et al., 2000; GIANNINI et al., 2006; ANDRADE et al., 2008; HAMAOKA et al., 2009; QADRI et al., 2011). Giannini et al. (2006) relataram, também, que o laser de Nd:YAG quando

usado em parâmetros bem estabelecidos e com uma potência baixa tem resultados favoráveis à descontaminação bacteriana na superfície de implantes sem danificar a mesma. Este crescimento não se manteve em 96 horas, quando houve uma queda na viabilidade celular neste grupo para os dois tipos celulares, resultado que vai de encontro com os encontrados por Qadri et al. (2011), que concluíram que o laser de Nd:YAG tem um resultado positivo à longo prazo para a melhora da saúde periodontal.

A idéia de usar a PDT como agente de condicionamento radicular surgiu de uma impressão clínica que nosso grupo obteve, quando a PDT foi utilizada para remover manchas extrínsecas de esmalte. Pudemos observar que além de remover as manchas, o tratamento havia causado uma desmineralização superficial do esmalte, que gerou hiperestesia dentinária e que foi tratada com aplicações de flúor. (dados enviados para publicação). A terapia fotodinâmica é baseada na associação de corante com um laser de baixa intensidade, com comprimentos de onda compatíveis, que vão gerar oxigênios livres, tóxicos para microorganismos alvo e não para as células (MAISCH, 2007). Os resultados de Chan e Lai (2003) sugerem que esta terapia pode ser utilizada para matar bactérias, resultados que corroboram com os achados de Sarkar e Wilson (1993); Soukos et al. (1996); Qin et al. (2008) e Luan et al. (2009).

O nosso estudo mostrou que o tratamento radicular com PDT promoveu um maior crescimento celular de FGH nos períodos de 48 e 72h, quando comparados ao controle e maior do que o Er:YAG e o Nd:YAG em 48h ($p < 0,05$), sugerindo que o tratamento com terapia fotodinâmica estimula a proliferação de FGH, resultados apoiados por outros estudos, onde a PDT teve resultados positivos em diminuir a viabilidade de periodontopatógenos, e que demonstraram também que a terapia não apresenta efeitos negativos sobre os tecidos adjacentes ou FGH e células epiteliais (SOUKOS et al., 1996; QIN et al., 2008; LUAN et al., 2009). Sobre as células de granulação óssea os resultados não foram melhores estatisticamente para este grupo, mas também se pode afirmar que não houve morte celular, o que sugere que também não haja citotoxicidade deste corante para as células ósseas. Fernandes et al. (2010) observaram radiograficamente que a perda óssea em bolsas induzidas em ratos imunossuprimidos tratados com PDT, foi significativamente menor do que nos tratados somente com RAR.

O condicionamento ácido da superfície radicular resulta na abertura dos túbulos dentinários e consequente exposição das fibrilas de colágeno (GARRET; CRIGGER; EGELBERG, 1978; RIRIE; CRIGGER; SELVIG, 1980; BARROS, 2013). A desmineralização favorece a adesão do coágulo em procedimentos cirúrgicos periodontais (POLSON; PROYER, 1983; WIKESJÖ et al., 1986; WIKESJÖ; BOGLE; NIVÉUS, 1992) e a adesão de células na superfície radicular (REGISTER; BURDICK, 1975; SELVIG et al., 1981; POLSON; PROYER, 1983; ZAMAN et al., 2000). A biomodificação radicular com ácido cítrico vem sendo amplamente utilizada ao longo dos anos tendo resultados clínicos e laboratoriais positivos.

No nosso estudo não foi diferente, as superfícies radiculares tratadas com ácido cítrico + tetraciclina nos períodos de 72 e 96h tiveram uma maior proliferação celular de FGH quando comparadas ao controle ($p < 0,05$) e quando comparadas aos outros tratamentos no período de 96h, o ácido cítrico + tetraciclina manteve um crescimento constante, apesar de não ter sido estatisticamente significante. As superfícies radiculares tratadas com ácido cítrico + tetraciclina também produziram maior proliferação em fibroblastos do que em células de granulação óssea em 72 e 96h, o que nos fez supor que o tratamento com ácido cítrico + tetraciclina foi melhor em longo prazo para FGH.

Estudo como o de Wikesjö et al. (1986) aponta que a chave para a regeneração do tecido conjuntivo em lesões periodontais é a preparação de superfícies duras com tetraciclina ou com outros agentes como fator de promoção da adesão e da proliferação celular de FGH, assim como o estudo de Boyko, Brunette e Melcher (1980), que sugeriu que o colágeno da raiz desmineralizada poderia fornecer um substrato melhor para o ligamento periodontal ou para os FGH se aderirem *in vivo*, quando comparados a uma superfície radicular mineralizada, deste modo também melhorando a cicatrização do periodonto.

Barros (2013) observou que a biomodificação química da raiz favorece o recobrimento radicular, aumentando também a faixa de gengiva ceratinizada. No estudo de Sant'Ana et al. (2012) foi observada a redução na profundidade de sondagem e na recessão, acompanhados de um ganho no nível de inserção clínica, em recessões profundas tratadas com enxerto de granulação óssea, indicando esta técnica associado ao recobrimento radicular favorecendo a regeneração periodontal, no nosso estudo, apesar de não termos encontrado diferenças estatisticamente

significantes para a viabilidade celular da GO, esta foi positiva e teve um crescimento progressivo tanto quando comparada ao controle, como quando comparada aos grupos experimentais, o que nos permite crer que a desmineralização da superfície radicular com ácido cítrico apesar de não ter induzido a proliferação celular de GO, também não a inibiu e nem causou morte celular.

Os resultados que obtivemos nesta pesquisa nos mostram que os tratamentos radiculares experimentais em geral geraram proliferação celular e não acarretaram morte tanto de FGH, quanto de GO. Para as células FGH, todos os tratamentos, com exceção da raspagem e alisamento radicular, promoveram sua proliferação. Portanto, num tratamento como o recobrimento radicular, onde essas células entrarão em contato com a raiz tratada, sugerimos o uso de qualquer uma das terapias. Já, num tratamento de regeneração de defeitos ósseos, onde a raiz tratada influencia o crescimento de células ósseas, sugerimos o uso do laser de Nd:YAG.

Para complementar os dados dessa pesquisa, um estudo para testar a biocompatibilidade, na adesão de fibroblastos gengivais humanos e células de granulação óssea sobre superfícies radiculares tratadas com os mesmos grupos experimentais, está sendo desenvolvido pelo nosso grupo.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Levando em consideração a metodologia empregada nesta pesquisa, pôde-se concluir que:

- ▀ Todos os tratamentos, com exceção da raspagem e alisamento radicular, estimularam a proliferação de fibroblastos gengivais humanos.
- ▀ Somente o tratamento com Nd:YAG estimulou a proliferação de células de granulação óssea humana.

Referências

REFERÊNCIAS

Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. *J Periodontol.* 1988 Apr;59(4):220-30.

Adriaens PA, Edwards CA, De Boever JA, Loesche WJ. Ultra structural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. *J Periodontol.* 1988 Aug;59(8):493-503.

Akiyama F, Aoki A, Miura-Uchiyama M, Sasaki KM, Ichinose S, Umeda M, et al. In vitro studies of the ablation mechanism of periodontopathic bacteria and decontamination effect on periodontally diseased root surfaces by erbium:yttrium–aluminum–garnet laser. *Lasers Med Sci.* 2011;26:193-204.

Aleo JJ, De Renzis FA, Farber PA. In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. *J Periodontol.* 1975;46:639-45.

American Academy of Periodontology. Sonic and ultrasonic scalers in periodontics. *J. Periodontol.* 2000;71:1792-801.

Andrade AKP, Feist IS, Panutti CM, Cai S, Zezell DM, De Michelli G. Nd:YAG laser clinical assisted in class II furcation treatment. *Lasers Med Sci.* 2008;23:341-7.

Aoki A, Ando Y, Watanabe H, Ishikawa I. In vitro studies on laser scaling of subgingival calculus with an erbium yag laser. *J Periodontol.* 1994;65:1097-1106.

Aoki A, Miura M, Akiyama F, Nakagawa N, Tanaka J, Oda S, et al. In vitro evaluation of Er.YAG laser seating of subgingival calculus in comparison with ultrasonic scaling. *J Periodont Res.* 2000;35:266-277.

Bagnato VS. Os fundamentos da luz laser. *Rev Bras Ensino Fis.* 2001;2(2):4-9.

Barbosa FA. Cultura primária e caracterização de células do tecido de granulação óssea (técnica do enxerto ósseo em neoformação) [monografia – graduação]. Bauru; Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2012.

Barros JPC. Efeitos do condicionamento ácido na descontaminação da superfície radicular e no recobrimento radicular: análise em MEV e estudo clínico randomizado. Dissertação [mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2013.

Boyko GA, Brunette DM, Melcher AH. Cell attachment to demineralized root surfaces in vitro. *J Periodont Res*. 1980;15:297-303.

Cavalcanti BN, Rode SM, Marques M. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J*. 2005;38:505-9.

Chan Y, Lai C-H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2003;18:51-5.

Chen YJ, Jeng JH, Lee BS, Chang HF, Chen KC, Lan WH. Effects of Nd:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2000;27:471-8.

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

Cogen RB, Garrison DC, Weatherford TW. Effect of various root surface treatments on the viability and attachment of human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 1983;54(5):277-82.

Dilsiz A, Canakci V, Aydin T. The Combined Use of Nd:YAG Laser and Enamel Matrix Proteins in the Treatment of Periodontal Infrabony Defects. *J Periodontol*. 2010;81:1411-8.

Fardal O, Lowenberg BF. A Quantitative Analysis of the Migration, Attachment, and Orientation of Human Gingival Fibroblasts to Human Dental Root Surfaces in vitro. *J Periodontol*. 1990;61:529-35.

Feist IS, De Micheli G, Carneiro SRS, Eduardo CP, Myiagi SPH, Marques MM. Adhesion and growth of cultured human gingival fibroblast and periodontally involved root surfaces treated by Er:YAG laser. *J Periodontol*. 2003 Mar;74(9):1368-75.

Fernandes LA, Martins TM, Almeida JM, Theodoro LH, Garcia VG. Radiographic assessment of photodynamic therapy as an adjunctive treatment on induced periodontitis in immunosuppressed rats. *J Applied Oral Sci*. 2010;18(3):237-43.

Franco EJ, Gregghi SLA, Assis GF. Comparative evaluation of periodontal radicular therapies conventional and er:yag laser – based on rat connective tissue response. *Oral Sci.* 2005;1;35-42.

Garret JS, Crigger M, Egelberg J. The effects of citric acid on diseased root surfaces. *J Periodontal Res.* 1978;13:155-63.

Gaspirc B, Skaleric U. Clinical evaluation of periodontal surgical treatment with an Er:YAG laser: 5-year results. *J Periodontol.* 2007;78:1864-71.

Genovese WJ. Laser de baixa intensidade. Aplicações terapêuticas em odontologia. São Paulo: Lovise; 2000.

Giannini R, Vassalli M, Chellini F, Polidori L, Dei R, Giannelli M. Neodymium:yttrium aluminum garnet laser irradiation with low pulse energy: a potential tool for the treatment of peri-implant disease. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Dec;17(6):638-43.

Gold SI, Vilardi MA. Pulsed laser beam effects on gingiva. *J Clin Periodontol.* 1994 Jul;21(6):391-6.

Gutknecht N, Eduardo CP. A odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica. São Paulo: Quintessence; 2004.

Hamaoka L, Moura-Netto C, Marques MM, Moura AAM. Nd:YAG laser improves biocompatibility of human dental root surfaces. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(5):715-20.

Herrero A, García-Kass AI, Gómez C, Sanz M, García-Núñez JA. Effect of two kinds of Er:YAG laser systems on root surface in comparison to ultrasonica scaling: an in vitro study. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(4):497-504.

Hughes FJ, Auger DW, Smales FC. Investigation of the distribution of the cementum-associated lipopolysacchareides in perdional disease by scanning electron microscope immunohistochemistry. *J Periodont Res.* 1988;23:100-6.

Hughes FJ, Smales FC. Immunohistochemical investigation of the presence and distribution of cementum associated lipopolysaccharides in periodontal disease. *J Periodont Res.* 1986 Mar;21(2):660-7.

International Organization for Standartization. ISO 10993-12. Biological evaluation of medical devices. Part 12: Sample preparation and reference materials. International Organization for Standardization. Geneva; 1996.

Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 4th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

Luan XL, Qin YL, Bi LJ, Hu CY, Zhang ZG, Lin J, et al. Histological evaluation of the safety of toluidine blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice. *Lasers Med Sci*. 2009;24:162-6.

Maiman TH. Stimulated emission of radiation in rubi. *Nature*. 1960 Aug;187:493-4.

Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future?. *Lasers Med Sci*. 2007;22:83-91.

Mello JB. Laser em odontologia. 1rd ed. Santos: São Paulo; 2001.

Midda M. The use of lasers in periodontology. *Curr Opin Dent*. 1992 Mar;2:104-8.

Mdinaradze N. Laser therapy in treatment of generalized parodontitis. *Georgian Med News*. 2006 May;134:94-6.

Monteiro LKB, Moreira MMSM. Uso tópico de antimicrobianos como um meio auxiliar no tratamento da periodontite. *Perionews*. 2011 jan-fev;5(1):42-9.

Moritz A, Beer F, Gohaekhay K, Schoop U, Strasse M, et al. Oral laser application. Berlim: Quintessence; 2006.

Mossman T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.

Myers TD. Lasers in dentistry. *CDC Rev*. 1991 Sep;84(8):26-9.

Ohira GOB. Avaliação comparativa da produção de fatores de crescimento TGF- β , IGF-1 e PDGF-AA por fibroblastos gengivais e periimplantares [monografia-especialização]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2012.

Ota-Tsuzuki C, Martins FL, Giorgetti AP, de Freitas PM, Duarte PM. In vitro adhesion of streptococcus sanguinis to dentine root surface after treatment with Er:YAG laser, ultrasonic system, or manual curette. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(5):735-41.

Passanezi E, Janson WA, Nahas D, Campos Jr A. Newly Forming Bone Autografts to Treat Periodontal Infrabony Pockets: Clinical and Histological Events. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1989;9(2):140-53.

Penteado R, Romito GA, Pustiglioni F, Marques MM. Morphological and proliferative analysis of the healing tissue in human alveolar sockets covered or not by an e-PTFE Membrane: A preliminary immunohistochemical and ultrastructural study. *Braz J Oral Sci*. 2005 Jan/Mar;4(12):664-9.

Pinheiro AB, Frame JW. An audit of CO2 laser surgery in the mouth. *Braz Dent J*. 1994;5(1):15-25.

Pinheiro ALB, Brugnera Júnior A, Zanin FAA. *Aplicação do laser na odontologia*. São Paulo: Santos; 2010.

Polson AM, Caton J. Factors Influencing Periodontal Repair and Regeneration. *J Periodontol*. 1982;53(10):617-25.

Polson AM, Proye MP. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. *J Periodontol*. 1983 Mar;54(3):141-7.

Qadri T, Javed f, Poddani P, Tunér J, Gustafsson A. Long-term effects of a single application of a water-cooled pulsed Nd:YAG laser in supplement to scaling and root planning in patients with periodontal inflammation. *Lasers Med Sci*. 2011 Nov;26(6):763-6.

Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodont Res*. 2008;43:162-7.

Register A, Burdick F. Accelerated Reattachment with Cementogenesis to Dentin, Demineralized in situ. I. Optimun Range. *J Periodontol*. 1975;44:646-51.

Ririe CM, Crigger M, Selvig KA. Healing of periodontal connective tissues following surgical wounding and application of citric acid in dogs. *J Periodont Res*. 1980 May;15(3):314-27.

Rühling A, Fanghänel J, Houshmand M, Kuhr A, Meisel P, Schwahn C, et al. Photodynamic therapy of persistent pockets in maintenance Patients-a clinical study. *Clin Oral Invest*. 2010;14:637-44.

Salmeron S, Rezende MLR, Consolaro A, Sant'Ana, ACP, Damante CA, Gregghi SLA, et al. Laser Therapy as an Effective Method for Implant Surface Decontamination: A Histomorphometric Study in Rats. J Periodontol. 2013 May;84(5):641-9.

Sant'Ana AC, Ferraz BFR, Rezende MLR, Gregghi SLA, Damante CA, Passanezi E. Newly forming bone graft: a novel surgical approach to the treatment of denuded roots. J Appl Oral Sci. 2012;20(3):392-8.

Sant'Ana AC, Marques MM, Barroso TE, Passanezi E, Rezende ML. Effects of TGF-beta1, PDGF-BB and IGF-1 on the rate of proliferation and adhesion of a periodontal ligament cell lineage in vitro. J Periodontol. 2007 Oct;78(10):2007-17.

Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. J Periodont Res. 1993;28:204-10.

Schultz RJ, Harvey GP, Fernandez-Beros ME, Krishnamurthy S, Rodriguez JE, Cabello F. Bactericidal effects of the neodymium:YAG laser: in vitro study. Lasers Surg Med. 1986;6:445-8.

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

Selvig KA, Ririe CM, Nilvéus R, Egelberg J. Fine structure of new connective tissue attachment following acid treatment of experimental furcation pockets in dogs. J Periodont Res. 1981 Jan;16(1):123-9.

Shetty B, Dinesh A, Seshan H. Comparative Effects of tetracyclines and Citric Acid and on dentin root surface of periodontally involved human teeth: a Scanning electron microscope study. J Indian Soc Periodontol. 2011 jan-apr;12(1):8-15.

Slot DE, Kranendonk AA, Van der Reijden WA, Van Winkelhoff AJ, Rosema NAM, Schulein WH, et al. Adjunctive effect of a watercooled Nd:YAG laser in the treatment of chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2011;38:470-8.

Smith CS, Setchell DJ, Harty FJ. Factors influencing the success of conventional root canal therapy – a five year retrospective study. Int Endod J. 1993;26:321-33.

Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. Lasers Surg Med. 1996;18:253-9.

Stern RH, Sogannaes RF. Laser beam on dental hard tissues [abstract 307]. J Dent Res. 1964;43(5):879. Presented in 42th General Meeting of IADR; 1964 Mar 19-22; Los Angeles.

Takamori ER, Figueira EA, Taga R, Sogayar MC, Granjeito JM. Evaluation of the cytocompatibility of mixed bovine bone. Braz Dent J. 2007;18(3):179-84.

Theodoro LH, Garcia VG, Haypek P, Zezell DM, Eduardo CP. Morphologic analysis, by means of scanning electron microscopy, of the effect of Er:YAG laser on root surfaces submitted to scaling and root planning. Pesqui Odontol Bras. 2002;26(4):308-12.

Theodoro LH, Sampaio JEC, Haypek P, Bachmann L, Zezell DM, Garcia VG. Effect of Er:YAG and diode lasers on the adhesion of blood components and on the morphology of irradiated root surfaces. J Periodontol. 2006;41:381-90.

Theodoro LH, Zezell M, Garcia VG, Haypek P, Nagata MJH, Milanezi J, et al. Comparative analysis of root surface smear layer removal by different etching modalities or erbium:yttrium-aluminum-garnet laser irradiation. A scanning electron microscopy study. Lasers Med Sci. 2010;25:485-9.

Walsh LJ. The current status of low-level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. Aust Dent J. 1997;42(4):247-54.

White JM, Goodis HE, Rose CM. Nd:YAG pulsed infrared laser for treatment of root surface. J Calif Dent Assoc. 1991 Nov;19(11):55-8.

Wikesjö UME, Baker PJ, Christersson LA, Genco RM, Lyall SH, Di Florio RM, et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. J Periotont Res. 1986;21:322-9.

Wikesjö UME, Bogle GC, Nivéus RE. Periodontal repair in dogs: effect of a composite graft protocol on healing in supraalveolar periodontal effects. J Periodontol. 1992 Feb;63(2):107-13.

Zaman KU, Sugaya T, Hongo O, Kato H. A study of attached and oriented human periodontal ligament cells to periodontally diseased cementum and dentin after demineralizing with neutral and low pH etching solution. J Periodontol. 2000 Jul;71(7):1094-9.

Zezell DM. Curso clínico de laser em odontologia. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo; 2001. Apostila de curso.

Apêndices

APÊNDICE A - Comparação entre os tipos celulares, tempos e diferentes grupos experimentais

	FGH						GO					
	CC	CD	ND	ER	PDT	AC	CC	CD	ND	ER	PDT	AC
96h	0,274 ^{defghilm}	0,320 ^{ghijklmnop}	0,501 ^{mnpq}	0,475 ^{lmnopqr}	0,481 ^{lmnopqr}	0,689 ^{rs}	0,393 ^{hijklmnopq}	0,222 ^{abcde fgh}	0,339 ^{ghijklmnop}	0,280 ^{efghijklmn}	0,232 ^{abcde fghi}	0,418 ^{hijklmnopq}
72h	0,246 ^{bcd efghij}	0,415 ^{hijklmnopq}	0,809 ^s	0,560 ^{pqr}	0,623 ^{qrs}	0,520 ^{opqr}	0,217 ^{abcde fgh}	0,135 ^{a bcd efgh}	0,508 ^{nopqr}	0,189 ^{abcde fgh}	0,149 ^{abcde fgh}	0,193 ^{abcde fgh}
48h	0,129 ^{abcde fgh}	0,190 ^{abcde fgh}	0,125 ^{abcde fgh}	0,138 ^{abcde fgh}	0,454 ^{ijklmnopq}	0,261 ^{cde fghijl}	0,123 ^{abcde fgh}	0,133 ^{abcde fgh}	0,208 ^{abcde fgh}	0,145 ^{abcde fgh}	0,196 ^{abcde fgh}	0,202 ^{abcde fgh}
24h	0,065 ^{abcde}	0,052 ^{abcde}	0,080 ^{abcde}	0,014 ^a	0,061 ^{abcde}	0,093 ^{abcde f}	0,047 ^{abcd}	0,043 ^{abc}	0,037 ^{abc}	0,027 ^{ab}	0,043 ^{abc}	0,062 ^{abcde}

APÊNDICE B - Porcentagens de crescimento celular nos grupos experimentais para os dois tipos celulares. O grupo de 24h foi considerado como 100%

	FGH				GO			
	ER	ND	PDT	AC	ER	ND	PDT	AC
24h	100	100	100	100	100	100	100	100
48h	960	156	742	282	541	557	462	323
72h	3905	1009	1019	562	706	1360	351	310
96h	3316	625	786	745	1042	907	545	671

APÊNDICE C - Parâmetros dos lasers

Autores	Laser	Comprimento de onda	Potência	Frequência	Densidade de energia/pulso	Densidade de energia	Tempo	Repetição	Amostras	Resultados
Schultz et al. (1986)	Nd:YAG	1060nm	20-120W	_____	_____	555 – 3333J/cm ²	10s	_____	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1667 J/cm ² - diminuição de bactérias <i>in vitro</i> . + corante = aumento dos efeitos bactericidas
Sarkar e Wilson (1993)	HeNe + 50µg/ml Azul de toluidina O	_____	7,3mW	_____	_____	_____	30s	_____	Placa subgengival	Complemento da raspagem mecânica no tratamento de doenças inflamatórias
Aoki, Ando e Watanabe (1994)	Er:YAG	2,94 µm	10W	_____	10 a 120mJ/pulso 30mJ/pulso	3,5 a 42,4 J/cm ²	20s	10pps	Remoção de tártaro subgengival	Remoção de cálculo subgengival 30mJ/pulso e 10,6J/cm ² /pulso, 10pps Pode ser usado para raspagem subgengival.
Soukos et al. (1996)	HeNe + 2µg/ml // 5µg/ml de Azul de toluidina O	632,8nm	7,3mW	_____	438mJ e 876mJ	_____	60s e 120s	_____	Queratinócitos e FGH	Não houve alteração na viabilidade celular
Aoki et al. (2000)	Er:YAG	2,94 µm	_____	_____	40mJ/pulso	14,2J/cm ²	60s	10pps	Fragmentos radiculares	Produziu modificações estruturais e térmicas removeu cálculo tanto quanto a raspagem ultrassônica

continua

continuação

Autores	Laser	Comprimento de onda	Potência	Frequência	Densidade de energia/pulso	Densidade de energia	Tempo	Repetição	Amostras	Resultados
Chen et al. (2000)	Nd:YAG		1 a 3W	_____	50 a 150mJ	_____	10s	10 a 30 pps	FGH	Contato = diminuiu a vitalidade (14% ~ 44%) 2mm = não diminuiu a vitalidade celular. Baixa dose de energia e pulsação diminuem os efeitos prejudiciais
Theodoro et al. (2002)	Er:YAG	2.94 µm	_____	10Hz	47mJ e 83mJ	0,57 e 1,03J/cm²	15s		Fragmentos de raiz	83mJ e 1,03J/cm² - remoção da <i>smear layer</i> e exposição dos túbulos dentinários, aspecto irregular na raiz. Estudos que comprovem a biocompatibilidade no processo de reparo
Chan e Lai (2003)	HeNe + azul de metileno	632,8nm	30mW	_____	_____	3,2J/cm² 6,4 J/cm²	30s 60s	_____	<i>Actinobacillus actinomycetencointans,</i> <i>Fusobacterium nucleatum,</i> <i>Porphyromonas gingivalis,</i> <i>Prevotella intermédia e</i> <i>Streptococcus sanguis</i>	Melhor resposta = PDT 21,2J/ cm² com 60s (laser de diodo) os parâmetros do laser de baixa são importantes e que combinados com um corante é bactericida
	AlGeAs + azul de metileno	665nm 830nm	100mW 100mW			10,6 J/cm² 21,2 J/cm²	30s 60s			
Feist et al. (2003)	Er:YAG	2.94 µm	_____	10Hz	60 and 100mJ	3 and 5J/cm²	10s		Superfícies radiculares e FGH	60mJ – melhor adesão e proliferação celular
Schwarz et al. (2003)	Er:YAG				160mJ/pulso	19,4J/cm²			Superfícies radiculares com cálculo	Er:YAG-superfícies radiculares lisas e homogêneas,
	InGaAsP GaAlAs	665nm	1,8W							mínima de perda de cimento e o cálculo subgengival foi removido, sem danos térmicos

continua

continuação

Autores	Laser	Comprimento de onda	Potência	Frequência	Densidade de energia/pulso	Densidade de energia	Tempo	Repetição	Amostras	Resultados
Franco, Gregghi e Assis (2005)	Er:YAG	2,94 µm	_____	_____	60mJ 100mJ	_____	15s	10pps	Fragmentos radiculares implantados em subcutâneo de ratos	Adesão de fibras colágenas 60mJ teve melhores resultados
Theodoro et al. (2006)	Er:YAG e diodo GaAlAs	2,94 µm 808 nm	_____	10Hz _____	60, 100mJ _____	7,6 e 12,9J/cm² 90 e 108J/cm²	15s	_____	Fragmentos radiculares e componentes sanguíneos	Sem diferenças com o controle. O Er:YAG não impediu a adesão dos componentes sanguíneos. Diodo inibiu a aderência
Gaspirc e Skaleric (2007)	Er:YAG	2,94 µm	_____	20Hz 10Hz 10Hz	180mJ/pulso 140mJ/pulso 100mJ/pulso	_____	_____	_____	Dentes unirradiculares com doença periodontal	redução da profundidade de sondagem e ganho do nível de inserção clínica por até 3 anos
Andrade et al. (2008)	Nd:YAG		1,5W	15Hz	100mJ/pulso	141,5J/cm²	60s		Defeitos de furca classe II em pacientes com periodontite crônica	Redução bacteriana em lesões de furca classe II imediatamente após a irradiação. Após 6 semanas não foi observada essa redução
Qin et al. (2008)	Laser de diodo + azul de toluidina	635nm	61mW	_____	_____	12J/cm²	75s	_____	Bactérias periodontais em ratos	Redução da flora bacteriana e dos sinais de inflamação da periodontite, sem danos aos tecidos adjacentes.
Hamaoka et al. (2009)	Nd:YAG	1064 nm	2W	20Hz	100mJ	124,34J/cm²	10s	_____	Fragmentos radiculares implantados em subcutâneo de ratos	Melhora da biocompatibilidade

continua

continuação

Autores	Laser	Comprimento de onda	Potência	Frequência	Densidade de energia/pulso	Densidade de energia	Tempo	Repetição	Amostras	Resultados
Luan et al. (2009)	Laser de diodo + azul de toluidina	635nm	61mW	_____	_____	60J/ cm ² 140J/cm ²	337s 660s	_____	Ratos	Seguro para o tratamento de periodontopatógenos sem causar efeitos prejudiciais nos tecidos adjacentes
Ota-Tsuzuki et al. (2009)	Er:YAG	2940nm	_____	10Hz	120mJ/pulso	8,4J/cm ²	_____	_____	Raízes bovinas e <i>S. sanguinis</i>	Laser = menor adesão dos <i>S. sanguinis</i> , menor abertura dos túbulos dentinários. periodontal após o debridamento
Dilsiz et al. (2010)	Nd:YAG	1064nm	1W	10Hz	100mJ	141,54J/cm ²	120s	_____	Defeitos ósseos	Melhorou os parâmetros clínicos, mas não foi melhor que o EDTA + proteínas de <u>matriz de esmalte</u> .
Fernandes et al. (2010)	GaAlAs + azul de toluidina	660nm	0,03W	_____	_____	57,14J/cm ² / pulso	133s	_____	Ratos com periodontite induzida - + dexametasona ou não.	PDT eficiente adjuvante à RAR em imunossuprimidos por dexametasona
Herrero et al. (2010)	Er:YAG	2940nm	_____	10Hz	120mJ// 140mJ// 160mJ	14,5J/cm ² 17J/cm ² 24,3J/cm ²	60s	_____	Fragmentos radiculares	Capacidade de remoção de cálculo e de abertura dos túbulos dentinários.
Rühling et al. (2010)	Laser de diodo + Fotossensibilizador	635nm	100mW	_____	_____	_____	60s	_____	Pacientes em terapia de manutenção de bolsa	PDT não foi melhor que ultrassom, mas mesmo assim pode ser considerado um tratamento adjuvante

continua

continuação

Autores	Laser	Comprimento de onda	Potência	Frequência	Densidade de energia/pulso	Densidade de energia	Tempo	Repetição	Amostras	Resultados
Theodoro et al. (2010)	Er:YAG	2,94 µm	_____	10Hz	47 and 83mJ	5.8 and 10.3 J/cm²	15s	_____	Fragmentos radiculares	Diferenças significantes do controle. Semelhante ao ácido cítrico, EDTA e ácido cítrico + tetraciclina
Akiyama et al. (2011)	Er:YAG	2,94 µm	_____	_____	40mJ/pulso	14,2J/cm²	_____	_____	Fragmentos radiculares e <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Debridamento semelhante ao do US e remoção de bactéria.
Qadri et al. (2011)	Nd:YAG	1064nm	4W	50Hz	80mJ/pulso	_____	60 a 120s	_____	Inflamação periodontal em pacientes	uma aplicação + RAR = efeito positivo a longo prazo sobre a saúde periodontal
Slot et al. (2011)	Nd:YAG	1064 nm	6W	50Hz	400mJ	142J/cm²	_____	_____	Debridamento de bolsas	3 meses - não houve melhora significativa

Anexos

ANEXO A - Termo de aceite do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
mferrari@fob.usp.br

Processo nº 086/2011

Bauru, 1 de setembro de 2011.

Senhor Professor,

Informamos que após o envio da documentação solicitada, o projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa **Avaliação do tratamento da superfície radicular por lasers em alta intensidade e terapia fotodinâmica na adesão e proliferação de fibroblastos gengivais humanos**, a ser desenvolvido pela aluna Paula Stephania Brandão Hage Karam, sob sua orientação, foi novamente analisado em reunião realizada no dia **31 de agosto de 2011**.

O CEP-FOB/USP considerou o projeto APROVADO lembrando que a condição de aprovação da pesquisa propriamente dita exige o que segue:

- que sejam encaminhados ao CEP-FOB/USP relatórios anuais sobre o andamento da pesquisa (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado;
- que sejam notificados ao CEP-FOB/USP, com a devida justificativa, qualquer modificação na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores;
- na apresentação do relatório final, incluir todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Prof. Dr. Eulair Passanezzi
Docente do Departamento de Prótese

ANEXO B - Termo de doação espontânea de dentes **Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Departamento de Prótese - Disciplina de Periodontia

e-mail: periodontia@fob.usp.br – Fone: (0XX14)3235-8278

TERMO DE DOAÇÃO ESPONTÂNEA

Eu, Osvaldo Alves Ruedotto, RG: 5717104,

do meus dentes extraídos para serem utilizados em pesquisas desenvolvidas na
Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru (USP).

Bauru, 16.06.2011

Assinatura do paciente

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Departamento de Prótese – Disciplina de Periodontia
e-mail: dep-prot@fob.usp.br – Fone: (0XX14)235-8277

TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS EXTRAÍDOS

Eu, maria dália cusin Altarego,
portador do documento de identificação tipo R.G.
número 11.948.569, nascido em 29.04.1960, aceito
doar meus dentes extraídos 16 à
Faculdade de Odontologia de Bauru para que sejam utilizados com finalidade de
ensino e pesquisa.

Bauru, 27 de 10 de 2011

MCOZ
Assinatura