Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Influência do uso do laser na prevenção da cárie radicular

Cesar Penazzo Lepri

Ribeirão Preto
2012

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Influência do uso do laser na prevenção da cárie radicular

Cesar Penazzo Lepri

Orientadora: Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

**INFLUÊNCIA DO USO DO LASER NA PREVENÇÃO
DA CÁRIE RADICULAR**

Cesar Penazzo Lepri

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Doutor em
Ciências – Programa: Odontologia
Restauradora – Área de concentração:
Odontologia Restauradora – Opção: Dentística

Orientadora: Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb

Ribeirão Preto
2012

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que seja citada a fonte.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento da Informação do Serviço de Biblioteca

Lepri, Cesar Penazzo

Influência do uso do laser na prevenção da cárie radicular.
Ribeirão Preto, 2012.

77p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontologia Restauradora – Opção: Dentística.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Guenka Palma-Dibb.

1. *Lasers* na Odontologia. 2. Cárie radicular. 3. Prevenção.

Lepri CP. Influência do uso do laser na prevenção da cárie radicular. [Tese de Doutorado].
Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo;
2012.

Banca Examinadora

Data da Defesa: __/__/__

Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo dom da vida,
por iluminar meu caminho, dando-me paz e serenidade.

Aos meus pais, Emílio César Lepri (*in memorian*) e Leila Maria Penazzo Lepri.

Exemplos de honestidade, trabalho, respeito e caráter;
nunca mediram esforços em proporcionar sempre
o melhor a seus filhos. Obrigado por tudo!

Aos meus irmãos, Lígia, Taísa e Edgar.
Pelo companheirismo e amizade em todos os momentos da minha vida.

À minha sobrinha e afilhada, Heloísa, e meu
cunhado e compadre, Daniel. Por constituírem e alegrarem nossa família.

A todos meus familiares que contribuíram,
direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb.
Sou imensamente grato por todas as oportunidades que me foram proporcionadas.
Depositou em mim sua confiança desde o primeiro ano de minha graduação.
São 10 anos trabalhando juntos, aproximadamente um terço de minha vida.
Professora, pesquisadora, educadora, incentivadora, mãe, atleta, etc e etc.
Exemplo de dedicação, trabalho, honestidade, inteligência e caráter.
Obrigado pela disponibilidade em todos os momentos.
Orientou-me de fato, de forma segura e objetiva.
Agradeço também pelas contribuições para o
meu crescimento pessoal e profissional.
E gratidão é o sentimento que vem do coração.
Muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representada pelo Digníssimo Diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros e pela Vice-Diretora Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva.

À Coordenação Geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto. Agradeço ao Prof. Dr. Manoel por todos os ensinamentos que me foram transmitidos, que certamente contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigado.

Ao Chefe do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva.

À Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto. Agradeço também a todos os Professores e Funcionários que secretariaram esta Comissão nos últimos cinco anos, período no qual pude aprender e muito, com pessoas experientes e engajadas, o direcionamento da pesquisa em busca de um bem comum, ou seja, sempre objetivando o crescimento e fortalecimento da FORP/USP.

À Juliana Jendiroba Faraoni Romano, pela determinação à pesquisa e auxílio em todas as fases da realização desta tese. Pela solicitude e cooperação no desenvolvimento dos projetos de pesquisa. Pela amizade do dia a dia.

Ao Walter Raucci Neto. Exemplo de seriedade e dedicação à vida acadêmica. Agradeço pela troca de experiências adquiridas ao longo destes anos.

Ao Vinícius Rangel Geraldo Martins. Pelos ensinamentos transmitidos durante a pós-graduação. Pela amizade e cooperação no desenvolvimento deste trabalho.

Às Profas. Dras. Maria Cristina Borsatto e Andréa Cândido dos Reis, membros da banca do meu exame de qualificação de mestrado.

Às Profas. Dras. Cláudia Helena Lovato da Silva e Wanessa Christine de Souza Zaroni, membros da minha defesa de dissertação de mestrado

Ao Prof. Dr. Vinícius Rangel Geraldo Martins e à Profa. Dra. Maria Angélica Hueb de Menezes Oliveira, membros do meu exame de qualificação de doutorado.

Aos Professores que estarão presentes na minha defesa de tese de doutorado.

A Todos os Professores do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A Todos os Professores da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A Todos os Funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Ao CNPq, pela concessão do auxílio financeiro sob a forma de bolsa de estudo.

Aos colegas de pós-graduação com os quais convivi em diferentes épocas da vida acadêmica: Cristiane Savaris, Daniel Galafassi, Francisco Carlos Rehder Neto, Fernando Akio Maeda, Walter Raucci Neto; Alessandra Marques Corrêa Afonso, Aline Evangelista de Souza Gabriel, Danielle Cristine Furtado Messias, Juliane Cristina Ciccone Nogueira, Vivian Colucci; Daniela Thomazatti Chimello de Sousa, Juliana Jendiroba Faraoni Romano, Michelle Alexandra Chinelatti, Cecília Pedroso Turssi, Carina Sinclér Delfino; André Luís Botelho, Daniel Mazzetto Crosio, Giovana Cherubini Venezian, Thaise Graciele Carrasco; Douglas Cecchin, Ana Paula Farina, Diogo Rodrigues Cruvinel, Rander Moreira Macedo, Rodrigo Gonçalves Soares, Lucas Novaes Teixeira, Larissa Moreira Spinola de Castro Raucci; Marcus Vinicius de Melo Ribeiro, Renato Jonas dos Santos Schiavoni, Flávio Henrique Umeda Gentil, Antônio de Luna Malheiros Segundo, Fabiano Gamero Aguilar; Fabrício Mariano Mundim, Daniela Nair Borges Felipucci, Marcelo Bighetti Toniollo, Karina Albino Lencioni, Fábio Afrânio de Aguiar Júnior, Vanessa Maria Fagundes Leite, Ana Carolina Maito Villela Rosa, Ingrid Machado de Andrade, Janisse Martinelli Borges de Oliveira, Ana Luiza de Almeida Neves, Ricardo Nogueira Fracon, Amanda Peracini, Ana Paula Ribeiro Novaes, Marta Maria Martins Giamatei Contente; Juliana dos Reis Derceli,

Danielle Torres Azevedo, Carmen Victoria Torres Toro, Kelly Machado de Andrade, Júlia Olien Sanches, Ana Bárbara de Araújo Loiola, Carolina Almeida Rodrigues, Renata Siqueira Scatolin, Dinah Ribeiro Amoras, Sandra Chiga, Carolina Assaf Branco, Vasti Claro de Araújo, Mateus Sgobi Cazal; Polliana Vilaça Silva, Geraldo Celso da Silva Onety, José Antonio Brufato Ferraz, José Estevam Vieira Ozório, Marco Aurélio Versiani, Graziela Bianchi Leoni, Frank Ykeda, Luis Eduardo Souza Flamini, Tiago Elias do Nascimento, Tiago Gilioli Varise, Samuel Henrique Câmara de Bem, Alexandre Capelli, Juliana Machado Barroso Xavier, Laise Daniela Carrasco Guerisoli, Roger Santos Scandiuizzi, Fábio Heredia Seixas, Cid Alonso Manicardi; Cristiane Tomaz Rocha, Rodrigo Alexandre Valério, Késsia Suênia Fidelis de Mesquita, Marília Pacífico Lucisano, Livia Alves Corrêa Moretti, Jackelline de Lemes Giuntini; Ingrid Webb Josephson Ribeiro, Fabrício Kitazono de Carvalho, Soraya Cheier Dib Gonçalves, Yamba Carla Lara Pereira, Danilo Maeda Reino; Giselle de Angelo Souza Leite, Marcela Cristina Damião Andrucio, Richard Honorato de Oliveira, Fernando Pando de Matos, Natércia Carreira Soriani, Rômulo Rocha Regis; Nathalia Ferraz Oliscovicz, Denise Cremonezzi Tornavoi; Mariangela Salles Pereira Nassar, Renata Filgueira Borges, Ira Cristina Uekama, Danilo Henrique Lattaro, Guilherme Bigi Monteiro; Cristiano Nakao, Rodrigo Tiozzi, Cássio do Nascimento, Flávio Henrique Carriço Nogueira Fernandes; Keico Graciela Sano Trauth, Ana Paula Terossi de Godoi, Lourdes Maria González Garcia; Carolina Paes Torres Mantovani, Rodrigo Galo, Cíntia Guimarães de Almeida, Jaciara Miranda Gomes da Silva, Renata Pereira Ramos; Talitha de Siqueira Mellara, Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, Maya Fernanda Mandrin Arnez, Cristhiane Ristum Bagatin Rossi, Taiana de Melo Dias, Cristina Bueno Brandão, Leonardo Biscaro Pereira; Bruna Rosa de Oliveira, Álvaro Augusto Junqueira Júnior, Adrielly Garcia Ortiz; Fernando José Dias, William Marcatti Amarú Maximiano, Erick Ricardo Silva, Fernando Cunha Biagini; Adriano Tadeu Dias Marangoni, Glaucete Crivelaro do Nascimento, Maily Rehder Wimmers Ferreira, e tantos outros que aqui não foram citados, mas que foram igualmente importantes para o desenvolvimento da pós-graduação da FORP/USP.

Aos pós-graduandos das áreas de Endodontia e Oclusão, pelo acolhimento e amizade durante as disciplinas cursadas nestas áreas e pelo convívio diário ao longo dos anos no Departamento de Odontologia Restauradora.

A Todos os integrantes da Associação de Pós-Graduandos da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto.

À Profa. Dra. Cláudia Benedita dos Santos, da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos de estatística aplicada à saúde e pelo curso de capacitação do uso do SPSS.

Ao Prof. Dr. Edson Zangiacomi Martinez, do Departamento de Medicina Social da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Exemplo de dedicação ao ensino, seriedade e competência. Possibilitou uma sólida formação ao longo de um ano cursando as disciplinas de Bioestatística I e II. Agradeço por toda fundamentação teórica adquirida e domínio prático das ferramentas de estatística, em especial dos softwares Stata e SAS.

À Profa. Dra. Yara Teresinha Correa Silva Sousa, da Faculdade de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, pela colaboração e solicitude para o desenvolvimento prático da fase experimental, em especial durante o emprego dos *lasers*.

Ao Prof. Dr. Edson Alfredo, da Faculdade de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, pelo auxílio no uso dos equipamentos de *lasers*.

A Todos os Professores e Técnicos da USP-São Carlos e UFSCAR que contribuíram no uso dos lasers e na análise de microscopia eletrônica de varredura, respectivamente.

Aos amigos Pedro e Melissa.

Aos amigos Andriago, Juliano, Márcio.

Ao Glauco; à Aninha.

Aos colegas da 77ª Turma FORP-USP.

Ao Carlos, secretário do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Isabel e Regiane, secretárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Amália e Maria Isabel, secretárias do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Luiza e Rosângela, funcionárias do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À técnica Patrícia Marchi, do Laboratório de Pesquisa em Dentística da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Ao técnico Reginaldo Santana, do Laboratório de Pesquisa em Endodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À técnica Débora Fernandes Costa Guedes, do Laboratório de Gerenciamento de Resíduos Odontológicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À técnica Ana Cristina, do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Ao técnico Edson Volta, do Laboratório Integrado de Pesquisa em Biocompatibilidade de Materiais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Ao leitor que se dedica a ler esta obra, pelo interesse e possibilidade de disseminação do trabalho realizado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	16
2 PROPOSIÇÃO	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Aspectos Éticos	27
3.2 Teste Preliminar	27
3.3 Delineamento Experimental	28
3.4 Seleção dos Dentes	29
3.5 Preparo dos Espécimes	30
3.6 Tratamentos dos Espécimes/Grupos Experimentais	32
3.7 Análise Morfológica em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) – 1ª Análise	35
3.8 Ciclos de pH	37
3.9 Seccionamento dos Espécimes para Análise de Profundidade de Desmineralização e Microdureza Longitudinal	38
3.10 Análise da Profundidade de Desmineralização em Microscópio Óptico	39
3.11 Microdureza Longitudinal	40
3.12 Análise Morfológica em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) – 2ª Análise	42
3.13 Quantificação dos Elementos Cálcio, Fósforo e Flúor através de Micro Análise por Energia Dispersiva de Raios-X (EDS)	42
3.14 Análise dos Dados	42
4 RESULTADOS	44
4.1 Morfologia da Superfície Irradiada visualizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura – 1ª Análise	45

4.2	Porcentagem de Desmineralização obtida através de Microscopia Óptica	47
4.3	Microdureza da Dentina Radicular Desmineralizada obtida através de Microdureza Longitudinal	48
4.4	Morfologia da Superfície Irradiada visualizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura – 2ª Análise	50
4.4	Quantificação dos Elementos Cálcio, Fósforo e Flúor mensurados através de Micro Análise por Energia Dispersiva de Raios-X	52
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÕES	62
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
	ANEXOS	74

Lepri CP. Influência de uso do laser na prevenção da cárie radicular. [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2012.

RESUMO

Objetivo: Este estudo avaliou a influência do uso de diferentes *lasers*, associados ou não à aplicação de fluoreto de sódio, na prevenção da cárie radicular. Materiais e Método: Para este estudo, 128 espécimes de dentina radicular humana (4,25mm X 4,25mm e 3,00mm de espessura) foram divididos aleatoriamente em 8 grupos: (G1=nenhum tratamento, G2=aplicação de flúor gel, G3=irradiação com o *laser* Er:YAG, G4=aplicação de flúor gel + irradiação com o *laser* Er:YAG, G5=irradiação com o *laser* Nd:YAG, G6=aplicação de flúor gel + irradiação com o *laser* Nd:YAG, G7=irradiação com o *laser* CO₂, G8=aplicação de flúor gel + irradiação com o *laser* CO₂). Para os grupos que receberam irradiação *laser*, metade do espécime foi irradiada ($\approx 9,00\text{mm}^2$) e a outra metade não (região controle). Nos grupos que receberam flúor gel, este foi aplicado antes da irradiação *laser* por 4 minutos. Após o tratamento dos espécimes, estes foram submetidos a desafios cariogênicos (ciclos de pH) em soluções desmineralizante (pH=5,0) e remineralizante (pH=7,0), por 6 horas e 18 horas, respectivamente, completando um período experimental de 14 dias. A avaliação dos tratamentos realizados nos grupos experimentais foi feita através dos seguintes testes: 1-) mensuração da porcentagem de desmineralização através de *microscopia óptica* – MO; 2-) avaliação da morfologia da superfície irradiada através de *microscopia eletrônica de varredura* – MEV; 3-) análise da microdureza das paredes de fundo da dentina radicular desmineralizada em diferentes profundidades através do teste de *microdureza longitudinal*; 4-) quantificação da porcentagem dos elementos cálcio, fósforo e flúor através de micro análise por *energia dispersiva de raios X* – EDS. Os dados foram submetidos a diferentes testes estatísticos, dependendo da propriedade analisada. Resultados: Os *lasers* Nd:YAG e

CO₂ foram mais eficazes na diminuição da porcentagem de desmineralização do que o *laser* Er:YAG. A menor porcentagem de desmineralização foi observada no G7. Na microscopia eletrônica da varredura, o *laser* Er:YAG proporcionou mudanças mais satisfatórias que os demais, na medida em que observou-se uma dentina mais lisa e homogênea, sem trincas ou áreas de carbonização. O *laser* Er:YAG também foi superior no aumento da resistência ácida da dentina, quando avaliada pelo teste de microdureza. O G3 obteve os maiores valores médios de microdureza Knoop. Em relação à análise de EDS, houve uma tendência de incorporação do flúor nas áreas irradiadas, principalmente após irradiação com os *lasers* Er:YAG e CO₂. Conclusões: Todos os *lasers* testados apresentaram resultados promissores na prevenção da cárie radicular e, para as propriedades analisadas, não houve sinergismo resultante da aplicação de flúor gel previamente à irradiação *laser*.

Palavras-chave: *Lasers* na Odontologia; cárie radicular; prevenção.

Lepri CP. Influence of laser irradiation on root caries prevention. [Tese de Doutorado].
Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo;
2012.

ABSTRACT

Objective: This study evaluated the influence of different lasers, associated or not with sodium fluoride application, in the prevention of root caries. **Materials and Methods:** For this study, 128 specimens of human root dentin (4.25mm X 4.25mm and 3.00mm thick) were randomly divided into 8 groups: (G1=no treatment, G2=application of fluoride gel, G3=Er:YAG laser irradiation, G4=application of fluoride gel + Er:YAG laser irradiation, G5=Nd:YAG laser irradiation, G6=application of fluoride gel + Nd:YAG laser irradiation, G7=CO₂ laser irradiation, G8= application of fluoride gel + CO₂ laser irradiation. For the groups that received laser irradiation, half of the specimen was irradiated ($\approx 9.00\text{ mm}^2$) and the other half was not (control region). In the groups that received fluoride gel, this was applied before laser irradiation for 4 minutes. After treatment of samples, these were submitted to a cariogenic challenge (pH cycles) in demineralizing (pH=5.0) and remineralizing (pH=7.0) solutions for 6 hours and 18 hours, respectively, completing an experimental period of 14 days. The evaluation of the proposed treatments in the experimental groups was performed using the following tests: 1-) measurement of the percentage of demineralization by light microscopy – MO; 2-) assessment of the morphology of the irradiated surface by scanning electron microscopy – MEV; 3-) microhardness analysis of the bottom walls of demineralized root dentin at different depths through the test of longitudinal microhardness; 4-) quantification of the percentage of the elements calcium, phosphorus and fluoride through micro analysis by energy dispersive X-ray - EDS. Data were submitted to different statistical tests, depending on the analyzed property. **Results:** Nd:YAG and CO₂ lasers were more effective in decreasing the percentage of demineralization than the Er:YAG laser. The lowest

percentage of demineralization was observed in the G7. In the scanning electron microscopy, the Er:YAG laser provided more satisfactory changes than the others, considering that there was a more smooth and homogeneous dentine, without cracks or carbonization areas. The Er:YAG laser was also greater in increasing the acid resistance of the dentin, when evaluated by microhardness test. The G3 obtained the highest average values of Knoop microhardness. Regarding the analysis of EDS, there was a tendency of incorporating fluoride in the irradiated areas, especially after irradiation with Er:YAG and CO₂ lasers. Conclusions: All the tested lasers showed promising results in the prevention of root caries and for the analyzed properties, no synergism resulting from the application of fluoride gel prior to laser irradiation was found.

Keywords: Lasers in Dentistry; root caries; prevention.

*“O tempo não nos pertence,
e ainda assim,
queremos dominá-lo”*

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

O aumento da longevidade de vida da população brasileira (IBGE 2010), associado à crescente difusão de conceitos da odontologia preventiva entre profissionais e pacientes, tem contribuído, de maneira geral, para uma melhor saúde bucal e para a manutenção de um maior número de elementos dentais, por um período mais prolongado de tempo, em adultos e idosos.

Em virtude disso vem ocorrendo um aumento na incidência de cárie radicular, sendo atualmente a lesão mais prevalente a atingir a população idosa. A lesão de cárie radicular já é considerada uma das principais causas de perda dos dentes em adultos, sendo que o problema se agrava com o envelhecimento do indivíduo (Bowden *et al.* 1990; Beck 1993; Zambon, Kasprzak 1995). Este fato se deve à exposição das raízes (por doença periodontal ou mesmo fisiologicamente), ao consumo de dieta cariogênica, ao controle de biofilme deficiente, à colonização por um biofilme específico (Shu *et al.* 2000) e a problemas crônicos de saúde que refletem na diminuição do fluxo salivar e em alterações na composição da saliva (Saunders, Handelman 1992).

Ao se considerar a individualidade do paciente, pode-se definir, com base nos fatores diretamente relacionados à cárie – hospedeiro, substrato cariogênico e microbiota específica – situações onde o risco do seu desenvolvimento é evidenciado. Assim, destacam-se a exposição da superfície radicular (hospedeiro), a dieta cariogênica (substrato) e o controle do biofilme

deficiente (microbiota específica) que, ao interagirem em função do tempo, levam à formação e progressão da cárie. Outros fatores, tais como fluxo e composição salivar, capacidade tampão, contato com fluoretos e história passada de cárie, que influenciam indiretamente o desenvolvimento de cárie radicular, também possibilitam determinar o maior ou menor risco de desenvolvimento da lesão (Fejerskov *et al.* 1991; Kidd, Fejerskov 2004).

A maior prevalência das lesões de cárie radicular ocorre em função do aumento da idade (Gustafsson *et al.* 1954; Katz 1980; Gustavsen *et al.* 1988; Fure, Zickert 1990; Varrela 1991; Joshi *et al.* 1994). Pacientes parcial ou totalmente incapacitados de realizarem procedimentos de higiene bucal, bem como os pacientes sob cuidados médico-hospitalares também são mais propensos ao seu desenvolvimento (MaccEntee *et al.* 1993).

As lesões de cárie radicular geralmente estão localizadas próximas à junção cimento-esmalte, considerada como um sítio de maior retenção de biofilme (Nyvad, Fejerskov 1982; Fejerskov 1994; Wefel 1994; Fejerskov, Nyvad 1996) e ocorrem quando o dente afetado apresenta a gengiva marginal retraída. Nestas situações, há exposição prévia do cimento e/ou dentina ao meio bucal. Entretanto, podem também estar localizadas subgengivalmente, associadas às bolsas periodontais (Sugihara *et al.* 2010).

Os primeiros sinais das lesões são caracterizados por pequenas áreas descoloradas e bem definidas, que se estendem ao longo da superfície radicular, coalescendo e formando lesões maiores. A maioria das lesões é rasa e de progressão lenta (Nyvad, Fejerskov 1982; Zambon, Kasprzak 1995; Banting 2001) e, radiograficamente, estas lesões iniciais aparecem como uma zona radiolúcida na raiz. O cimento, no terço cervical da raiz dos dentes, apresenta uma espessura em torno de 30 a 50µm. Por isso, deve-se notar que, na maioria dos casos, a escovação inadequada dos dentes ou a raspagem imprópria das superfícies da raiz danifica ou remove o

cimento radicular, propiciando a presença de dentina exposta (Frank 1990). Em relação à cor, a cárie radicular ativa apresenta-se amarela e marrom clara; quando as lesões estão inativas, a cor das lesões se torna mais escurecida (Nyvad, Fejerskov 1982; Kidd 1989; Raval, Birkhed 1991).

Numa comparação entre cárie radicular e coronária, a possibilidade de desenvolvimento da primeira frente a um mesmo desafio cariogênico é maior devido à diferença na composição química e estrutural dos tecidos acometidos, pois o esmalte possui um pH crítico de dissolução em torno de 5,2 a 5,7 enquanto que o pH crítico para o cimento e a dentina é de apenas 6,0 a 6,7 (Hoppenbrouwers *et al.* 1987; Eliassom *et al.* 1992; Wefel 1994). Isto pode ser explicado pela diferente composição dos tecidos envolvidos. O cimento e a dentina são tecidos que possuem maior quantidade de água, carbonatos e matéria orgânica, o que faz com que as lesões se iniciem em um pH mais alto do que para o esmalte (Eliassom *et al.* 1992; Wefel 1994). Como a dentina apresenta maior predisposição à perda de minerais, observa-se que uma dieta mesmo sem altas concentrações de carboidratos pode ser cariogênica para a superfície radicular, se associada a uma microbiota específica (Sumney, Jordan 1974; Seichter 1987; Fure, Zickert 1990; Keltjens *et al.* 1993).

Em relação à microbiota, o *Streptococcus mutans* representa o principal agente etiológico da cárie dental em humanos, já demonstrado em estudos de detecção por métodos de cultivo laboratorial (Li *et al.* 2003) e por métodos moleculares (Becker *et al.* 2002). O sucesso da colonização por estreptococos é atribuído a três fatores: 1-) habilidade deste microrganismo em aderir a quase todas as superfícies presentes em seu ambiente natural, 2-) capacidade em utilizar rapidamente nutrientes disponíveis sob oscilações nas condições do meio e 3-) habilidade em tolerar, resistir ou mesmo destruir as defesas imunológicas do hospedeiro (Jenkinson, Lamont 1997). Este microrganismo reúne vários fatores de virulência para o desenvolvimento da cárie

dental, como a acidogenicidade e aciduricidade, a capacidade de adesão e acúmulo nas superfícies dentárias e a síntese de polissacarídeos intracelulares, como forma de armazenamento de substrato e de proteínas extracelulares solúveis e insolúveis em água (Loesche 1986; Hajishengallis, Michalek 1999).

Em relação à microbiota envolvida no aparecimento e desenvolvimento da cárie radicular, ainda existem muitas controvérsias na literatura. Enquanto enfatizava-se a importância do *Actinomyces* como principal agente etiológico da cárie radicular (Ellen *et al.* 1985), estudos mais recentes (Lynch, Beighton 1994; van Houte 1994) enfatizaram a importância do *S. mutans* e do *Lactobacillus*, indicando que o papel daqueles microrganismos era menor do que o descrito. Acredita-se que a presença de microrganismos proteolíticos é importante para o início e progressão da cárie radicular, principalmente quando há associação do *S. mutans* e do *Lactobacillus*.

Devido ao difícil acesso à lesão e isolamento do campo operatório nestes tipos de lesões, o conhecimento da doença cárie, bem como das medidas de prevenção já estabelecidas ou que estão em estudo, parece ser a maneira mais racional de se controlar essa doença e dessa forma evitar, num futuro próximo, a alta prevalência da mesma num grupo populacional que se torna cada vez maior.

O processo físico-químico de desmineralização *versus* remineralização que ocorre entre esmalte e o ambiente oral é observado também na superfície radicular (Fejerskov, Nyvad 1996; Nyvad *et al.* 1997). Os íons flúor podem interferir no processo físico-químico da formação e progressão da cárie, inibindo a desmineralização e potencializando a remineralização (Thylstrup, Fejerskov 1995; Thevadass *et al.* 1996; ten Cate 1999; Featherstone 2000). Em altas concentrações também podem atuar sobre o metabolismo bacteriano, reduzindo a formação de

ácidos (Hamilton 1990). Contudo, o efeito do flúor é parcial, uma vez que não impede a instalação da doença frente a um alto desafio cariogênico. Além disso, pesquisas têm mostrado que as lesões de cárie radicular envolvem tanto a desmineralização quanto a destruição da matriz orgânica da dentina (Frank 1990; Nyvad, Fejerskov 1990; Schupbach *et al.* 1990). Portanto, torna-se extremamente necessário o desenvolvimento de métodos alternativos que interfiram positivamente no processo de DES/RE, no sentido de se buscar a prevenção dos tecidos dentais.

Uma opção promissora para a prevenção é a utilização da irradiação *laser*. Desde a demonstração do aumento da resistência ácida do esmalte dental irradiado com o *laser* de rubi (Sognnaes, Stern 1965), muitos trabalhos têm sido realizados na área de prevenção de cárie e têm demonstrado a redução de solubilidade do esmalte dental após a irradiação com *lasers* de alta intensidade.

Estudos sobre os efeitos dos *lasers* (Kantola 1972; Featherstone *et al.* 1998; Kantorowitz *et al.* 1998) têm se concentrado no aumento da resistência à cárie através da redução da velocidade de desmineralização da subsuperfície de esmalte e dentina, contudo se desconhece as exatas razões que levam à inibição da formação de lesões cariosas com a utilização de *lasers*.

Os relatos da literatura (McCormack *et al.* 1995; Featherstone *et al.* 1998; Kantorowitz *et al.* 1998) têm demonstrado que a irradiação do esmalte dental com *lasers* tem promovido redução significativa da perda mineral. Já em relação à dentina, observa-se ocorrência de inibição do processo de desmineralização através da formação de zonas de recristalização, fusão e derretimento deste tecido em virtude da utilização de altas densidades de energia (Kantola 1972; Nelson *et al.* 1986; Nammour *et al.* 1992). No entanto, considerando que o conteúdo mineral da dentina é muito menor que do esmalte e ela possui características estruturais diferentes (Featherstone 1994), a densidade de energia necessária para modificá-la positivamente

em relação à resistência ácida parece ser menor do que a utilizada para o esmalte (Rodrigues *et al.* 2004).

A irradiação da dentina também pode aumentar a concentração mineral da mesma através da remoção preferencial da água e proteínas inerentes a este tecido. O emprego de *laser* pode promover a recristalização da dentina, o crescimento do tamanho dos cristais de hidroxiapatita e a formação de uma dentina de maior grau de cristalinidade, estruturalmente modificada, que se assemelha à estrutura cristalina da hidroxiapatita do esmalte normal (Kantola 1972; Magalhães *et al.* 2008).

O emprego do *laser* CO₂ associado com flúor pode proporcionar um efeito sinérgico de inibição da desmineralização, pois pode proporcionar a incorporação do flúor dentro da estrutura cristalina (Gao *et al.* 2006). Além disso, o *laser* Nd:YAG associado ao flúor tem demonstrado que pode promover uma maior absorção de íons fluoreto na dentina irradiada comparada com a não irradiada (Glauche *et al.* 2005), contudo o efeito sobre a resistência à desmineralização ainda não está claro. O *laser* Er:YAG já demonstrou ser eficiente em aplicações dentárias devido à alta absorção do seu comprimento de onda (2,94µm) pela água (Braun *et al.* 2010), revelando, por exemplo, sua alta eficácia na redução do diâmetro dos túbulos dentinários sob a condição específica de não utilizar refrigeração, obliterando parcialmente os túbulos dentinários abaixo do limiar de ablação (Schwarz *et al.* 2002). Segundo estudos prévios (Aranha *et al.* 2005; Cakar *et al.* 2008) a utilização deste dispositivo diminuiu o fluido dentinário pela evaporação das camadas superficiais.

Uma vez que são escassos os estudos que avaliaram o efeito de *lasers* sobre a prevenção de lesões de cárie de superfície radicular associado ou não ao flúor, é importante a realização de

estudos *in vitro* que avaliem o uso de *lasers* para que se consiga determinar o potencial cariostático destes equipamentos na superfície dentinária.

2.Proposição

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo *in vitro* foi avaliar a efetividade do uso de *lasers* no tratamento de prevenção do desenvolvimento da lesão de cárie radicular formada após desafio cariogênico (ciclos de pH), analisando a influência do tipo de *laser* (Er:YAG, Nd:YAG e CO₂) associado ou não ao flúor, por meio das análises de:

- porcentagem de desmineralização através de *microscopia óptica* – MO;
- morfologia da superfície irradiada através de *microscopia eletrônica de varredura* – MEV;
- microdureza das paredes de fundo da dentina radicular desmineralizada em diferentes profundidades através do teste de *microdureza longitudinal*;
- quantificação dos elementos cálcio, fósforo e flúor através de micro análise por *energia dispersiva de raios X* – EDS.

3. Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Anexo 1) e teve início após a aprovação do mesmo (Processo nº 2009.1.87.58.0 - CAAE nº 0009.0.138.000-09).

3.2 Teste preliminar

Com o objetivo de se determinar a melhor distância de irradiação para que os parâmetros fossem sub-ablativos, realizou-se este estudo preliminar com os *lasers* Er:YAG, Nd:YAG e CO₂.

Empregou-se a superfície da dentina radicular bovina para avaliar as alterações morfológicas através de microscopia eletrônica de varredura. Para isso, dezesseis amostras (5X5mm) obtidas de dezesseis incisivos bovinos foram divididas aleatoriamente em 8 grupos (n=2). Metade de cada espécime (2,5X5mm) foi irradiada (modo varredura) usando os seguintes parâmetros: G1: irradiação com o *laser* Er:YAG – 60mJ/2Hz; fluxo de água de 2,0mL/min e distância de irradiação de 4mm; G2: similar ao G1, com distância de irradiação de 8mm; G3: similar ao G1, com distância de irradiação de 16mm; G4: irradiação com *laser* Nd:YAG – 0,5W/10Hz, sem refrigeração, modo contato; G5: similar ao G4, com distância de irradiação de

1mm; G6: irradiação com o *laser* CO₂ – 0,2W/20Hz, sem refrigeração e distância de irradiação de 6mm; G7: similar ao G6, com distância de irradiação de 8mm; G8: similar ao G6, com distância de irradiação de 10mm. A outra metade de cada espécime foi mantida como controle (sem irradiação) para análise comparativa. Após isso, as amostras foram preparadas e analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens obtidas foram avaliadas qualitativamente através da comparação da área irradiada com a área controle. O *laser* Er:YAG mostrou nas distâncias de 4 e 8mm uma dentina mais homogênea, sem muitas alterações morfológicas. A irradiação com o *laser* Nd:YAG foi mais satisfatória na distância de 1mm, pois apresentou mínima ablação na superfície. Por fim, o *laser* CO₂ resultou em mudanças superficiais quando a distância de irradiação foi 8mm, seguida de 10mm, entretanto, pequenas áreas de ablação também foram observados com o uso deste *laser*. Dessa forma, pode-se observar que todos os *lasers* utilizados podem modificar a estrutura da superfície da dentina radicular e cada equipamento tem uma distância ideal de irradiação para promover mínimas alterações na superfície, sem áreas ablacionadas e sem trincas e fraturas (Lepri *et al.* 2010).

A partir dos resultados obtidos nesta etapa, tornou-se possível a determinação da distância que foi utilizada para cada *laser* juntamente com os parâmetros sub-ablativos de irradiação.

3.3 Delineamento experimental

O fator em estudo foi: tratamento dos espécimes em oito níveis (nenhum tratamento, aplicação de flúor gel, irradiação com o *laser* Er:YAG, aplicação de flúor gel + irradiação com o *laser* Er:YAG, irradiação com o *laser* Nd:YAG, aplicação de flúor gel + irradiação com o *laser*

Nd:YAG, irradiação com o *laser* CO₂, aplicação de flúor gel + irradiação com o laser CO₂). A amostra do experimento foi de 128 espécimes de dentina radicular humana divididos nestes 8 grupos (n=16).

Este estudo foi realizado por meio de um delineamento em blocos completos casualizados, com uma repetição de cada grupo experimental por bloco. As variáveis de resposta quantitativa foram: porcentagem de desmineralização, microdureza longitudinal e porcentagem dos elementos cálcio, fósforo e flúor. A morfologia da superfície irradiada representou a variável de resposta qualitativa.

3.4 Seleção dos dentes

Foram selecionados molares humanos irrompidos, em função (observado se havia pequenas facetas de desgaste), com raízes completamente formadas, extraídos por razões não relacionadas a esta pesquisa e provenientes do Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Anexo 2). Os dentes foram limpos com curetas periodontais e pasta de pedra pomes com água aplicada com escovas de Robinson. Em seguida, realizou-se com auxílio de uma sonda exploradora o exame visual em estereomicroscópio (Nikon Inc. Instrument Group, Melville, NY, EUA) para seleção dos dentes para o estudo. A esterilização dos dentes foi realizada com solução de formalina 10% (pH=7,0) preparada com tampão fosfato, na qual ficaram imersos durante uma semana; foram lavados abundantemente e então, armazenados em água destilada e deionizada a 4°C, trocando a água diariamente até completar um período de 7 dias.

3.5 Preparo dos espécimes

As raízes dentais foram separadas dos remanescentes coronários utilizando-se um disco diamantado sob refrigeração à água, acoplado em uma máquina de corte (Minitom, Struers A/S, Copenhagen, DK-2610, Denmark). Em seguida, as raízes foram cortadas no sentido mésio-distal, obtendo-se assim duas metades (uma vestibular e outra lingual/palatina). Cada metade radicular foi novamente seccionada para a obtenção de blocos de dentina de 4,25mm X 4,25mm e 3,00mm de espessura, resultando em uma área superficial de aproximadamente 18,0mm².

Metade do espécime foi irradiada ($\approx 9,0\text{mm}^2$) e a outra metade não (região controle). Para proteger a área que não seria irradiada, foram recortados pedaços de fita isolante no tamanho de $\approx 9,0\text{mm}^2$, que foram posicionados sobre a superfície da dentina radicular e que foram removidos após os tratamentos. Foram feitas marcas em uma das laterais para determinar o lado controle do espécime.

A Figura 1 mostra detalhes da fase de preparo dos espécimes.

Figura 1. Preparo dos espécimes

3.6 Tratamento dos espécimes/grupos experimentais

Realizou-se o tratamento dos espécimes com os diferentes *lasers*, associados ou não ao flúor gel, de acordo com os grupos (n=16) descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Tratamento empregado nos diferentes grupos

Grupo	Tratamento
G1	Nenhum tratamento (controle)
G2	Aplicação de NaF
G3	Irradiação com o <i>laser</i> Er:YAG
G4	Aplicação de NaF seguida de irradiação com o <i>laser</i> Er:YAG
G5	Irradiação com o <i>laser</i> Nd:YAG
G6	Aplicação de NaF seguida de irradiação com o <i>laser</i> Nd:YAG
G7	Irradiação com <i>laser</i> CO ₂
G8	Aplicação de NaF seguida de irradiação com o <i>laser</i> CO ₂

As formas de aplicação dos tratamentos foram:

- **flúor em gel**, composto por 2% de flúor gel neutro (Flugel DFL®) aplicado na superfície da dentina com microbrush e deixado por 4 minutos. Após esse tempo, o excesso do gel foi removido com gaze. O símbolo químico NaF, escrito nas tabelas e durante o texto, indica fluoreto de sódio a 2%.
- o equipamento de ***laser* Er:YAG** modelo Kavo Key Laser II (Kavo Co., Biberach, Alemanha), com alta densidade de potência, comprimento de onda de 2,94μm, energia ajustável de 60 a 500mJ, frequência de 1 a 15Hz, duração de pulso de 250 a 500μs, distância focal ideal de 12,0mm entre a lente de saída do feixe e o tecido alvo. Por apresentar comprimento de onda

localizado na região do infravermelho do espectro eletromagnético, um laser diodo (comprimento de onda=635nm; potência=1mW) foi usado como feixe guia. O diâmetro da saída da ponta é de 0,63mm. Para o tratamento da superfície radicular o feixe foi empregado no modo não-contato, desfocado, com energia por pulso de 60mJ (subablativo) e taxa de repetição de 2Hz. A distância entre a lente de saída do *laser* e o alvo foi de 4,0mm, determinada em estudo preliminar. Os espécimes receberam o tratamento deste laser com refrigeração à água e fluxo constante de 2,0mL/minuto, que foi regulado por meio de uma válvula localizada na parte superior da caneta (contra-ângulo *laser* 2051) conectada ao equipamento *laser* por meio de uma fibra óptica.

- o equipamento de ***laser* Nd:YAG** modelo SmartFile (DEKA, Itália), com alta densidade de potência, comprimento de onda de 1,064 μ m, frequência de 1Hz a contínua Este *laser* apresenta comprimento de pulso de 250 μ m e taxa de repetição de 5 a 10Hz. A irradiação foi realizada perpendicularmente à amostra utilizando uma fibra de quartzo com diâmetro de 300 μ m, desfocado, no modo não-contato com a distância de irradiação empregada de 1,0mm, determinada em estudo preliminar. Foi empregada a potência de 0,5W e taxa de repetição de 10Hz. Os espécimes receberam o tratamento deste *laser* sem refrigeração.

- o equipamento de ***laser* CO₂** modelo PC015A 15W (Shanghai Jue Hua Laser Tech. Development Co. Ltd.). Para o tratamento da superfície radicular, o feixe foi empregado no modo não-contato, desfocado, com potência de 0,2W e taxa de repetição de 20Hz. A distância entre a lente de saída do *laser* e o alvo foi de 8,0mm, determinado em estudo preliminar. Os espécimes receberam o tratamento deste *laser* sem refrigeração.

Para todos os *lasers* utilizados, a padronização da distância foi realizada utilizando-se um dispositivo que acopla a caneta do *laser* a uma distância pré-estabelecida. O segmento foi

posicionado numa base que se movimenta, permitindo que toda a superfície do espécime que receberia a irradiação laser fosse irradiada na mesma distância (modo varredura). O tempo total de irradiação para cada espécime foi 10 segundos.

Para os grupos em que houve associação flúor + *laser*, primeiramente o flúor em gel foi aplicado na superfície da dentina com microbrush e deixado por 4 minutos. Após esse tempo, o excesso do gel foi removido com gaze e a irradiação laser foi realizada na sequência.

A descrição detalhada dos parâmetros utilizados para cada tipo de *laser* está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros dos *lasers* dos grupos experimentais

Parâmetros	<i>Lasers</i>		
	Er:YAG	Nd:YAG	CO ₂
Fabricante	Kavo Co., Alemanha	Deka, Itália	Shanghai Jue Hua Laser Tech. Development Co. Ltd., China
Modelo do equipamento	Kavo Key Laser II	Smartfile	PC015-A
Comprimento de onda (nm)	2.940	1.064	10.600
Taxa de repetição (Hz)	2	10	20
Diâmetro aproximado do feixe (mm)	0,63	0,30	0,40
Distância de irradiação (mm)	4	1	8
Potência de saída	0,6W	0,5W	0,2W
Fluxo de água	2,0mL/min	Sem refrigeração	Sem refrigeração
Tempo de irradiação (s)	10	10	10

3.7 Análise morfológica em microscópio eletrônico de varredura (MEV) – 1ª Análise

Após a irradiação *laser*, três espécimes de cada grupo foram preparados para serem analisados em MEV (n=3). Nesta primeira análise em MEV, estes espécimes foram preparados imediatamente após a irradiação *laser*, ou seja, não foram submetidos aos ciclos de pH (DES/RE), com intuito de verificar a ação do tratamento sobre o substrato sem ação do processo des/re. Estas amostras foram imersas em solução de glutaraldeído (2,5%) tamponado com cacodilato de sódio (0,1M) com pH=7,4 por doze horas a 4°C. Em seguida, foram imersas em 10mL de tampão cacodilato de sódio (0,1M) em pH=7,4 por uma hora e após foram lavados com água destilada por um minuto. A desidratação foi realizada em série crescente de etanol 25%, 50% e 75% por 20 minutos cada, 95% por 30 minutos e 100% por 60 minutos e então deixados em HMDS por 10 minutos (Raucci-Neto *et al.* 2012) (Figura 2). Cada grupo teve as amostras fixadas em *stubs*, com a superfície tratada voltada para face superior para a análise da superfície, usando fita adesiva apropriada e metalizada com cobertura de ouro. Foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura FEG-XL30 (JEOL Ltd, Tokyo 190-0012, Japan) operando em 25KV (Figura 3). Foi feita a varredura de toda a superfície para verificar as alterações causadas no tecido dentinário, comparando a área irradiada com a área não-irradiada. Foram feitas fotomicrografias das áreas mais representativas de cada região.

Figura 2. Esquema da desidratação em série crescente de etanol.

Figura 3. Imagem dos espécimes fixados no *stub* e recobertos com uma fina camada de ouro (A) e microscópio eletrônico de varredura utilizado para análise morfológica (B).

3.8 Ciclos de pH

Dez amostras de cada grupo foram submetidas à ciclagem de pH para simular uma situação de altíssimo risco a cárie (n=10). Cada amostra foi mergulhada em recipientes plásticos, de modo a deixar exposta apenas a superfície da dentina em estudo (4,25mmX4,25mm), correspondente à área irradiada e área controle. Assim, as amostras foram armazenadas individualmente, em recipientes nos quais foram adicionadas as soluções desmineralizante (DES) e remineralizante (RE).

A solução desmineralizante (2mmol/l de cálcio, 2mmol/l de fosfato e 75mmol/l de acetato em pH=4,6) foi colocada nos recipientes/espécimes e o volume foi determinado de acordo com a área exposta de cada fragmento e permaneceram imersas por 6 horas (Featherstone 1996). Depois disso, foram removidas e lavadas com água destilada e deionizada por 10 segundos e levemente secas com papel absorvente. Em seguida, as amostras receberam a solução remineralizante (1,5mmol/l de cálcio, 0,9mmol/l de fosfato, 150mmol de cloreto de potássio e 20mmol/l de tampão cacodilato de pH=7,0) que apresenta um grau de saturação dos minerais semelhante à saliva, e semelhante ao proposto por ten Cate & Duijsters (1982), e ficaram imersas nesta por 18 horas.

As soluções DES e RE foram substituídas diariamente, e as ciclagens ocorreram por 2 semanas (Figura 4), sendo que após 5 dias as amostras ficaram individualmente imersas em solução remineralizante por 2 dias (final de semana), totalizando então, um período experimental de 14 dias (definido em estudo piloto). As amostras ficaram armazenadas em estufa a 37°C durante todo este período.

Figura 4. Metodologia empregada para ciclagem de pH

3.9 Seccionamento dos espécimes para análise de profundidade de desmineralização e microdureza longitudinal

Após o desafio cariogênico, os espécimes foram lavados com água deionizada, a superfície tratada foi protegida com cera e incluiu-se em resina acrílica transparente, de modo que a superfície tratada ficou livre. Em seguida, foram levados à máquina de corte e seccionados, dividindo-se a área exposta ao meio, tomando-se o cuidado que tanto a área experimental como a área controle estivesse na mesma secção (Figura 5). Uma metade foi destinada à obtenção de duas finas secções para análise da profundidade de desmineralização por microscopia óptica. A outra metade foi utilizada para o teste de microdureza longitudinal.

Figura 5. Desenho esquemático da secção dos espécimes

3.10 Análise da profundidade de desmineralização em microscópio óptico

As amostras examinadas em microscópio óptico ($n=10$) foram seccionadas longitudinalmente com secções de aproximadamente 0,5mm de espessura (2 secções por espécime). As secções foram planificadas e polidas manualmente utilizando lixas d'água de granulação #1200, até chegar a uma espessura entre 100-150 μm (Figura 6). As secções foram então observadas em um microscópio óptico (Zeiss) utilizando água como meio de embebição. As imagens foram capturadas e digitalizadas para análise da superfície adjacente à irradiação e com auxílio de um software (AxioVision Rel. 4.8.2) foi medida a profundidade da lesão em mm^2 de toda extensão da área exposta. A análise foi realizada com objetiva de 5x, tendo um aumento final de 50x após a captura da imagem.

Figura 6. Preparo do espécime para avaliação em microscopia óptica

3.11 Microdureza longitudinal

Após a secção dos espécimes ($n=10$), a metade destinada à análise de microdureza foi levada em politriz (Arotec® APL-4, Brasil), sob refrigeração, utilizando-se lixas d'água 600 e 1200 nessa ordem e disco de feltro com pasta de alumina, para polimento, até a obtenção de uma superfície lisa e brilhante. Posteriormente, os espécimes foram limpos por 10 minutos em ultrassom. Foi utilizado um microdurômetro (Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2000, Japan), com auxílio de um penetrador de diamante para dureza Knoop (KHN) aplicando uma carga de 10gf com duração de 20 segundos, de maneira que a ponta do penetrador permaneceu

perpendicular à subsuperfície de dentina. As penetrações foram realizadas na região de subsuperfície da lesão formada, tanto da área irradiada como da área controle. A primeira marcação foi localizada 30 μ m abaixo da região mais funda da lesão de cárie e as marcações seguintes foram feitas a 60 μ m, 90 μ m e 120 μ m, na mesma direção. Para cada profundidade foram realizadas 3 medidas, com distância aproximada de 500 μ m entre elas. A profundidade de 200 μ m também foi examinada para certificar que as 4 profundidades mensuradas terminaram antes do final da lesão (Figura 7). Uma média dos valores de microdureza Knoop foi obtida para cada amostra. Às áreas controle de cada grupo foram empregadas para comparação entre elas e determinação da similaridade dos grupos. Como a análise prévia estatística mostrou similaridade, pode-se realizar apenas a comparação da microdureza das áreas tratadas e determinar a diferença delas em relação ao grupo controle. Os dados foram comparados com testes estatísticos listados abaixo.

Figura 7. Representação das profundidades analisadas no teste de microdureza

3.12 Análise morfológica em microscópio eletrônico de varredura (MEV) – 2ª Análise

Após a irradiação *laser*, seguida dos ciclos de pH (DES/RE), três novos espécimes de cada grupo, diferentes daqueles espécimes utilizados na primeira análise em MEV, foram preparados para serem analisados em MEV (n=3). Nesta segunda análise em MEV, estes espécimes foram preparados após a irradiação *laser* seguida dos ciclos de pH (DES/RE). Os passos para preparo e análise em MEV são os mesmos descritos anteriormente, porém nesta 2ª Análise o microscópio operou em 10KV. Novamente comparou-se a área irradiada com a área não-irradiada.

3.13 Quantificação dos elementos cálcio, fósforo e flúor através de micro análise por energia dispersiva de raios-X (EDS)

O preparo das amostras foi o mesmo utilizado para a MEV, assim como o microscópio (n=3). As amostras analisadas foram as mesmas utilizadas na 1ª Análise em MEV (sem DES/RE) ou então na 2ª Análise em MEV, ou seja, espécimes irradiados e posteriormente submetidos aos ciclos de pH (DES/RE). Foram mensuradas as porcentagens dos elementos cálcio, fósforo e flúor e foi realizada a comparação da área irradiada com a área controle.

3.14 Análise dos Dados

Foram realizados diferentes testes estatísticos para cada propriedade analisada, descritos a seguir:

- **Análise morfológica da superfície:** realizou-se análise qualitativa e comparativa entre os grupos com as imagens obtidas em microscopia eletrônica de varredura, tanto dos espécimes não submetidos aos ciclos de DES/RE (1ª Análise da MEV) quanto com os espécimes submetidos aos ciclos de DES/RE (2ª Análise da MEV).

- **Profundidade de desmineralização:** após análise dos dados, observou-se que a distribuição não foi normal. Desta forma, os dados foram submetidos ao teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis com nível de confiança estabelecido em 5%.

- **Microdureza longitudinal:** uma vez verificada que a distribuição dos dados foi normal (Shapiro-Wilks) e homogênea (Levene's), estes foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério com $\alpha=5\%$. Para diferenciação das médias, realizou-se o teste de Fisher LSD, estabelecendo novamente o nível de confiança em 5%.

- **Quantificação dos elementos cálcio, fósforo e flúor:** obteve-se a proporção lado irradiado/lado não irradiado de cada íon analisado por EDS e realizou-se análise descritiva dos dados.

4.Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Morfologia da superfície irradiada visualizada através de *microscopia eletrônica de varredura* – 1ª Análise

As imagens de microscopia eletrônica de varredura estão apresentadas na Figura 8. O grupo G1 apresentou morfologia diferente de todos os outros grupos experimentais. No grupo G2 alguns túbulos ficaram abertos após a aplicação do NaF. Os grupos G3, G5 e G7 apresentaram pequenas trincas (setas), sendo que no G5 e G7 houve áreas isoladas de carbonização e fusão (asteriscos). Nos grupos G4, G6 e G8 a aplicação prévia do NaF permitiu uma ação mais branda na dentina radicular, com ausência de fusão e trincas menores.

Figura 8. Análise morfológica (1000x) de cada grupo experimental na 1ª Análise de MEV

4.2 Porcentagem de desmineralização obtida através de *microscopia óptica*

Na análise dos dados observou-se diferença estatística entre os tratamentos superficiais ($p < 0,05$), tendo o G4 (22,83%) apresentado resultados similares ao G3 (20,00%) e G1 – controle (19,08%) onde se observou maior porcentagem de desmineralização. O grupo controle (G1: 19,08%) apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do G7 (CO₂ sem flúor: 14,48%), que por sua vez apresentou os melhores resultados (menor porcentagem de desmineralização). Por sua vez, os grupos G5 (15,96%), G6 (15,72%), G7 (14,48%) e G8 (17,50%) foram similares entre si (Tabela 3). Os grupos de Er:YAG (21,41%) foram maiores que os grupos de Nd:YAG (15,84%) e os grupos de CO₂ (15,99%). No grupo da aplicação de NaF (G2) a porcentagem de desmineralização foi de 16,17%. Na Figura 9 observam-se as imagens de microscopia óptica e a delimitação da porcentagem de desmineralização.

Figura 9. Visualização através de microscópio óptico e mensuração da porcentagem de desmineralização com o uso do Software Axio Vision

Tabela 3. Valores de porcentagem de desmineralização (desvio padrão) obtidos nos grupos experimentais

Grupo	Desmineralização (%)
Nenhum tratamento (controle)	19,08 (1,48) ^{b,c}
Aplicação de NaF	16,17 (1,11) ^{ab}
Irradiação com <i>laser</i> Er:YAG	20,00 (0,97) ^c
Aplicação de NaF seguida de irradiação com o <i>laser</i> Er:YAG	22,83 (2,15) ^c
Irradiação com o <i>laser</i> Nd:YAG	15,96 (1,07) ^{ab}
Aplicação de NaF seguida de irradiação com o <i>laser</i> Nd:YAG	15,72 (1,13) ^{ab}
Irradiação com o <i>laser</i> CO ₂	14,48 (1,55) ^a
Aplicação de NaF seguida de irradiação com o <i>laser</i> CO ₂	17,50 (1,49) ^{ab}

* A mesma letra sobrescrita indica similaridade estatística ($p > 0,05$)

4.3 Microdureza da dentina radicular desmineralizada obtida através de *microdureza longitudinal*

A Tabela 4 mostra os valores médios de microdureza (desvio padrão) nos grupos experimentais. Na análise dos dados observou-se diferença estatística entre os grupos tendo o grupo G3, irradiado com o *laser* Er:YAG, apresentado uma maior dureza e estatisticamente diferente de todos os grupos ($p < 0,05$). Os demais grupos mostraram resultados similares em relação ao grupo controle. Imagens do teste de microdureza estão representadas na Figura 10.

Tabela 4. Valores de microdureza Knoop (desvio padrão) dos grupos experimentais

Grupo	Número de Microdureza Knoop
Nenhum tratamento (controle)	28,65 (3,59) ^a
Aplicação de NaF	28,50 (4,32) ^a
Irradiação com <i>laser</i> Er:YAG	41,30 (3,92) ^b
Aplicação de NaF seguida de irradiação com o <i>laser</i> Er:YAG	29,12 (4,73) ^a
Irradiação com o <i>laser</i> Nd:YAG	25,75 (4,03) ^a
Aplicação de NaF seguida de irradiação com o <i>laser</i> Nd:YAG	22,65 (3,01) ^a
Irradiação com o <i>laser</i> CO ₂	27,35 (4,12) ^a
Aplicação de NaF seguida de irradiação com o <i>laser</i> CO ₂	23,90 (2,87) ^a

* A mesma letra sobrescrita indica similaridade estatística ($p > 0,05$)

Figura 10. Fotos obtidas no teste de microdureza

4.4 Morfologia da superfície irradiada visualizada através de *microscopia eletrônica de varredura* – 2ª Análise

As imagens de microscopia eletrônica de varredura estão apresentadas na Figura 11. Pode-se observar presença de desmineralização superficial em todos os grupos, exceto no G7, que apresentou desmineralização mais acentuada nas trincas (setas) proporcionadas pelo laser. Com o uso do *laser* Er:YAG, observou-se dentina radicular irradiada (G3 e G4) mais homogênea, com poucas irregularidades e com a rede colágena bem exposta e organizada. Por sua vez, os grupos G5, G6 e G8 apresentaram a rede de colágeno desorganizada e colabada. Houve áreas isoladas de carbonização (asteriscos) nos espécimes irradiados com os *lasers* Nd:YAG e CO₂ (G5 e G8, respectivamente). A irradiação com laser Nd:YAG sem aplicação prévia de NaF (G5) também causou trincas (setas).

Figura 11. Análise morfológica (1000x) de cada grupo experimental na 2ª Análise de MEV

4.5 Quantificação dos elementos cálcio, fósforo e flúor mensurados através de micro análise por *energia dispersiva de raios X*

O Quadro 1 apresenta os resultados obtidos nas análises de EDS.

Os espécimes foram irradiados e posteriormente submetidos aos ciclos de DES/RE na 2ª Análise de EDS, pois o objetivo do presente trabalho foi justamente avaliar o efeito dos *lasers* na prevenção de cárie radicular em condições de altíssimo risco à cárie (ciclagens de pH).

Através da comparação da proporção das porcentagens dos elementos químicos da área irradiada pela área não irradiada, observou-se que no grupo irradiado com *laser* CO₂ a porcentagem de cálcio foi 12% superior na área irradiada, enquanto o fósforo foi superior em 16%. Para o *laser* Nd:YAG, houve pequeno decréscimo destes elementos de 4% e 1% para cálcio e fósforo, respectivamente. O *laser* de Er:YAG apresentou porcentagem superior de cálcio (7%) e fósforo (1%) na área irradiada, quando comparada à não irradiada. Em relação ao flúor, verificou-se uma tendência de incorporação deste íon após irradiação *laser*, principalmente após o uso do Er:YAG (27%) e CO₂ (22%). A Figura 11 mostra exemplos de gráficos obtidos no EDS.

Quadro 1. Porcentagem de cada elemento analisado nos diferentes grupos experimentais

	Tratamento	Lado não irradiado			Lado irradiado			Proporção lado irradiado/lado não irradiado		
		Ca	P	F	Ca	P	F	Ca	P	F
1ª Análise	Er:YAG - s/F - sem DES/RE	22,79	12,67	13,92	28,78	13,79	9,72	1,26	1,09	0,70
	Er:YAG - c/F - sem DES/RE	33,15	15,24	11,33	31,35	15,08	9,49	0,95	0,99	0,84
	Nd:YAG - s/F - sem DES/RE	29,84	12,39	9,50	28,89	12,14	10,76	0,97	0,98	1,13
	Nd:YAG - c/F - sem DES/RE	28,61	12,09	8,35	30,61	11,86	11,38	1,07	0,98	1,36
	CO2 - s/F - sem DES/RE	33,45	12,84	7,93	30,21	12,51	9,95	0,90	0,97	1,25
	CO2 - c/F - sem DES/RE	37,01	13,66	6,04	35,99	13,29	8,12	0,97	0,97	1,34
2ª Análise	Er:YAG - s/F - com DES/RE	33,27	15,13	6,15	31,12	14,53	7,79	0,94	0,96	1,27
	Er:YAG - c/F - com DES/RE	32,35	17,32	4,40	34,53	17,54	4,23	1,07	1,01	0,96
	Nd:YAG - s/F - com DES/RE	41,76	14,72	7,04	37,95	15,00	6,33	0,91	1,02	0,90
	Nd:YAG - c/F - com DES/RE	40,10	15,04	6,94	38,34	14,86	5,57	0,96	0,99	0,80
	CO2 - s/F - com DES/RE	30,36	11,10	9,55	33,95	12,84	7,91	1,12	1,16	0,83
	CO2 - c/F - com DES/RE	34,96	15,45	5,73	36,68	15,60	6,97	1,05	1,01	1,22

Figura 12. Gráficos obtidos na análise através de energia dispersiva de raios-X

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

A população mundial está envelhecendo e com isso vem ocorrendo uma maior proporção adulta e idosa. Essas mudanças surgiram como resultado de medidas de saúde pública que vem reduzindo a mortalidade infantil. Assim, mais crianças estão crescendo até a idade adulta. Além disso, houve um aumento da expectativa de vida da população, como consequência da melhoria da dieta, do estilo de vida e cuidados adicionais à saúde. Estas mudanças foram mais drásticas no fim do século 20 e início deste século, e se prevê continuar no futuro próximo (Walls, Meurman 2012).

Simultaneamente com o aumento do número de idosos, houve um aumento de pessoas com a manutenção de maior número de dentes na cavidade bucal. E inevitavelmente observa-se um incremento de cárie radicular (Walls, Meurman 2012). Dessa forma, considerando que os adultos e idosos constituirão a maior porcentagem das sociedades no futuro em muitos países industrializados (Esteves-Oliveira *et al.* 2011), faz sentido refletir agora em novos métodos para a prevenção de lesões de cárie radicular. Nesta direção, foi realizada a presente pesquisa na qual se empregou três diferentes tipos de *lasers* na prevenção de cárie radicular.

O desenvolvimento de lesões cariosas na superfície radicular está associado à composição e quantidade de biofilme, à dieta, à composição e ao fluxo de saliva, e à exposição ao flúor (Ravald *et al.* 1986). Pacientes que apresentam raízes expostas e redução do fluxo

salivar devido à medicação são particularmente de alto risco para ocorrência de cárie radicular (Banting *et al.* 2001). Este tipo de cárie progride de forma lenta e as lesões são geralmente rasas (Fejerskov *et al.* 1991). A desmineralização é aproximadamente duas vezes mais rápida em comparação ao esmalte dentário, uma vez que o pH crítico para a desmineralização de esmalte é de 5,2-5,7 e na dentina 6,0-6,7. O cemento e a dentina apresentam uma menor quantidade de minerais e cristais de hidroxiapatita. Isto é em parte responsável pelo processo de desmineralização que ocorre em um pH mais elevado (Hoppenbrouwers *et al.* 1987).

A prevenção é preferida à restauração, devido às dificuldades encontradas para restaurar a superfície radicular que, às vezes, são inacessíveis e de difícil isolamento. O uso do flúor é geralmente aceito como método preventivo e remineralizante. Vários estudos (Hoppenbrouwers *et al.* 1987; Dérand *et al.* 1989; Featherstone 1999) *in vitro* demonstraram um efeito remineralizante da aplicação tópica de fluoretos na cárie radicular. Entretanto, é necessária uma maior quantidade de fluoreto para a remineralização da lesão na raiz do que no esmalte (Herkströter *et al.* 1991; Rodrigues *et al.* 2011), além da alta frequência de uso. No presente estudo, observou-se que não houve diferença na profundidade de desmineralização e dureza do substrato na comparação entre o grupo controle (G1) e o grupo que recebeu aplicação de NaF (G2). Estes achados vão ao encontro dos observados em diferentes estudos (Wallace *et al.* 1993; Paraskevas *et al.* 2004; Vale *et al.* 2011) os quais demonstraram que o uso isolado de fluoreto de sódio em gel não foi capaz de proteger a superfície radicular contra a desmineralização. Somado a isso, uma provável explicação dos resultados obtidos é a de que foi feita apenas uma aplicação tópica de flúor, sem associação com bochechos e dentifrícios fluoretados que são necessários para o controle da doença cárie em indivíduos de alto risco.

Por sua vez, a combinação de fluoretos e *lasers* na prevenção de cárie tem sido extensamente estudada na superfície de esmalte dentário, entretanto, existe uma escassez de estudos sobre seus efeitos na prevenção de cárie em dentina radicular, que foi exatamente o objetivo do presente estudo. Nesta pesquisa observou-se que não houve diferenças entre os grupos experimentais. A aplicação de NaF antes da irradiação *laser* promoveu uma dentina mais homogênea e uniforme do que nos grupos irradiados, quando apenas o *laser* foi usado. Porém, nas outras análises, não foi observado um mecanismo de sinergismo entre irradiação *laser* e fluoretos. Mesmo em esmalte o efeito sinérgico ainda não foi comprovado (Azevedo *et al.* 2012; Chen, Huang 2009).

Durante um desafio cariogênico, o fluoreto de cálcio (CaF_2) frouxamente aderido pode liberar os íons fluoretos, contribuindo para inibir a desmineralização e aumentar a remineralização (Gao *et al.* 2006). O fluoreto fortemente aderido e integrado à estrutura cristalina pode aumentar a estabilidade dos cristais e a resistência ácida. Provavelmente isto também ocorra na dentina. Além disso, o fluoreto fortemente aderido pode servir de reservatório de fluoreto, com uma maior substantividade do que o fluoreto fracamente aderido (Gao *et al.* 2006). É importante notar que, no presente estudo, o NaF foi aplicado antes da irradiação. Portanto, estudos adicionais são necessários para determinar se os mesmos efeitos seriam observados no caso de aplicação de fluoreto após a irradiação *laser*, visto que a associação não produziu melhores resultados do que quando aplicados separadamente.

Quando analisado isoladamente as irradiações com os diferentes tipos de *laser*, observou-se que os resultados foram promissores para aumentar a resistência ácida da dentina radicular, especialmente para o *laser* Er:YAG (G3), o qual apresentou maiores valores de microdureza após os tratamentos propostos. Verificou-se também que a irradiação *laser* promoveu uma

superfície mais resistente à cárie do que a simples aplicação de NaF a 2%, além de ocorrer um incremento na quantidade de íons Ca e F.

A literatura evidenciou que a irradiação com o *laser* Er:YAG parece ser efetiva na prevenção de cárie, entretanto, para que as áreas irradiadas com este *laser* não sejam termicamente degeneradas quando irradiadas, é necessário refrigeração à água (Hossain *et al.* 2000).

Em relação à irradiação com *laser* CO₂, as embocaduras dos túbulos dentinários foram obliteradas, além de ocorrer o processo ablativo que removeu parcialmente e superficialmente a estrutura dentinária em algumas pequenas áreas; além disso, observou-se um incremento na quantidade de Ca, P e F. A associação NaF + CO₂ mostrou uma aparência mais homogênea e lisa da estrutura superficial e menor alteração superficial. Os achados da presente pesquisa estão em concordância com estudo prévio (Cakar *et al.* 2008) que usou metodologia similar em relação à irradiação com o *laser* CO₂ e obteve obliteração dos túbulos dentinários.

O *laser* Nd:YAG vem sendo amplamente pesquisado e em estudo recente (Al-Omari, Palamara 2012) observaram que a irradiação com este *laser* resultou na redução dos valores de microdureza da dentina hígida e provocou significantes danos térmicos ao substrato. No presente trabalho, observou-se que a dureza da dentina não foi inferior ao grupo controle, porém não foi capaz de manter os valores de microdureza similares àqueles encontrados na dentina não-irradiada. O subsequente desafio cariogênico realizado no estudo da presente tese provavelmente acentuou a diminuição na microdureza. Esse comportamento possivelmente se deu pela baixa potência empregada, que pode ter promovido alteração menos evidente. Este *laser* obteve os resultados menos indicativos de promover resistência à desmineralização quando comparado aos *lasers* Er:YAG e CO₂, inclusive sem ocorrer o aumento na quantidade de íons analisada.

Outra hipótese para explicar a razão pela qual os *lasers* podem aumentar a resistência ácida do esmalte dental foi proposta por Hsu e colaboradores no ano de 2000, que sugeriram a teoria do “bloqueio orgânico”, quando a desnaturação parcial da matriz orgânica causada pela irradiação *laser* pode bloquear o caminho de difusão no esmalte, resultando no atraso da desmineralização do esmalte. Bloqueando o caminho de difusão pode-se afetar a porosidade e a área de micro-superfície do esmalte. A matéria orgânica, causando uma diminuição estatisticamente significativa no volume do poro e na área de superfície no esmalte após irradiação *laser*, pode ser determinante no bloqueio orgânico induzido pela irradiação *laser* e subsequentemente contribuir para a prevenção da desmineralização do esmalte (Ying *et al.* 2004). Se esta teoria do bloqueio orgânico pudesse ser extrapolada para a superfície dentinária, estes estudos sustentariam os resultados obtidos no presente estudo.

No presente trabalho o *laser* Er:YAG foi o único *laser* que empregou-se a refrigeração. Quando a refrigeração a água não é utilizada, a dentina sofre um processo de derretimento que envolve, entre outras coisas, a obliteração dos túbulos dentinários (Aranha *et al.* 2009). Isto dificulta a penetração de ácidos na dentina, tornando este tecido mais resistente à desmineralização. Entretanto, no presente estudo, fissuras e pequenas áreas de carbonização na dentina radicular foram observadas quando os espécimes foram irradiados com Nd:YAG e CO₂, provavelmente porque estes *lasers* foram usados sem refrigeração. O motivo de não ter sido empregada a refrigeração nestes dois tipos de laser foi: o equipamento de CO₂ não tem disponibilidade e o Nd:YAG, embora presente, não se conhece o efeito da refrigeração com este equipamento, pois não existem estudos prévios neste sentido de avaliação.

Estas considerações sobre refrigeração são de extrema importância porque indicam que maiores fluências do que as usadas neste estudo poderiam causar dano térmico significativo na

dentina irradiada (Hossain *et al.* 1999; Geraldo-Martins *et al.* 2005). Além disso, maiores fluências poderiam conduzir à ablação dentinária e também induzir uma maior perda mineral durante um desafio ácido (Hossain *et al.* 2001). Esta perda mineral provavelmente ocorreu no presente estudo, uma vez que se observou menores valores de microdureza nos grupos irradiados com Nd:YAG e CO₂ do que na dentina irradiada com Er:YAG.

Portanto, analisando os resultados obtidos no presente estudo, foi possível confirmar, após o teste de microdureza Knoop e avaliação em microscopia eletrônica de varredura, que o *laser* Er:YAG promoveu um aumento na resistência ácida da dentina radicular humana, sem causar carbonização ou trincas. Além disso, os dados demonstraram que a aplicação de NaF não resultou um efeito de sinergismo quando combinado com a irradiação *laser*, em relação ao aumento da resistência ácida. Neste momento, novos estudos devem ser desenvolvidos para entender como o tecido irradiado se torna mais resistente aos ácidos e para verificar possíveis alterações morfológicas e estruturais causadas na dentina radicular após irradiação *laser*.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

Baseado na metodologia empregada, nos resultados obtidos e nas restrições de um estudo *in vitro*, pode-se concluir que:

- os três tipos de *laser* promoveram algumas alterações favoráveis, seja na microdureza, morfologia e porcentagem de desmineralização;
- a irradiação com os *lasers* Nd:YAG e CO₂ proporcionou menores porcentagens de desmineralização após desafio cariogênico;
- o *laser* Er:YAG promoveu uma maior microdureza longitudinal sugerindo maior resistência ácida do tecido irradiado;
- a dentina radicular irradiada apresentou-se mais lisa e homogênea após o uso do Er:YAG. Os *lasers* Nd:YAG e CO₂ causaram trincas na superfície dentinária;
- as superfícies irradiadas com os *lasers* Er:YAG e CO₂ apresentaram maior porcentagem dos elementos cálcio, fósforo e flúor quando comparadas às respectivas superfícies não irradiadas;
- não houve sinergismo resultante da associação do flúor gel usado previamente à irradiação laser.

7.Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Al-Omari WM, Palamara JE. The effect of Nd:YAG and Er,Cr:YSGG lasers on the microhardness of human dentin. *Lasers Med Sci* 2012 Apr 24 [Epub ahead of print].

Aranha AC, Domingues FB, Franco VO, Gutknecht N, Eduardo Cde P. Effects of Er:YAG and Nd:YAG lasers on dentin permeability in root surfaces: a preliminary in vitro study. *Photomed Laser Surg* 2005; 23(5):504-8.

Aranha AC, Pimenta LA, Marchi GM. Clinical evaluation of desensitizing treatments for cervical dentin hypersensitivity. *Braz Oral Res* 2009; 23(3):333-9.

Azevedo DT, Faraoni-Romano JJ, Derceli Jdos R, Palma-Dibb RG. Effect of Nd:YAG laser combined with fluoride on the prevention of primary tooth enamel demineralization. *Braz Dent J* 2012; 23(2):104-9.

Banting DW. The diagnosis of root caries. *J Dent Educ* 2001; 65(10):991-6.

Beck JD. The epidemiology of root surface caries: North American studies. *Adv Dent Res* 1993; 7(1):42-51.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível em http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.
Abreviaturas dos periódicos em conformidade com *Baseline*.

Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3):1001-9.

Bowden GH, Ekstrand J, McNaughton B, Challacombe SJ. Association of selected bacteria with the lesions of root surface caries. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5(6):346-51.

Braun A, Jepsen S, Deimling D, Ratka-Krüger P. Subjective intensity of pain during supportive periodontal treatment using a sonic scaler or an Er:YAG laser. *J Clin Periodontol* 2010; 37(4):340-5.

Cakar G, Kuru B, Ipci SD, Aksoy ZM, Okar I, Yilmaz S. Effect of Er:YAG and CO₂ lasers with and without sodium fluoride gel on dentinal tubules: a scanning electron microscope examination. *Photomed Laser Surg* 2008; 26(6):565-71.

Chen CC, Huang ST. The effects of lasers and fluoride on the acid resistance of decalcified human enamel. *Photomed Laser Surg* 2009; 27(3):447-52.

Dérاند T, Lodding A, Petersson LG. Effect of topical F⁻ solutions on caries-like lesions in root surfaces. *Caries Res* 1989; 23(3):135-40.

Eliasson S, Krasse B, Söremark R. Root caries. A consensus conference statement. *Swed Dent J* 1992; 16(1-2):21-5.

Ellen RP, Banting DW, Fillery ED. *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* detection in the assessment of dental root surface caries risk. *J Dent Res* 1985, 64(10):1245-9.

Esteves-Oliveira M, Zezell DM, Ana PA, Yekta SS, Lampert F, Eduardo CP. Dentine caries inhibition through CO₂ laser (10.6µm) irradiation and fluoride application, in vitro. *Arch Oral Biol* 2011; 56(6):533-9.

Featherstone JD. Fluoride, remineralization and root caries. *Am J Dent* 1994; 7(5):271-4.

Featherstone JD. Modeling the caries-inhibitory effects of dental materials. *Dent Mater* 1996; 12(3):194-7.

Featherstone JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; 27(1):31-40.

Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc* 2000; 131(7):887-99.

Featherstone JD, Barrett-Vespone NA, Fried D, Kantorowitz Z, Seka W. CO2 laser inhibitor of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. *J Dent Res*. 1998 Jun;77(6):1397-403.

Fejerskov O, Luan WM, Nyvad B, Budtz-Jørgensen E, Holm-Pedersen P. Active and inactive root surface caries lesions in a selected group of 60- to 80-year-old Danes. *Caries Res* 1991; 25(5):385-91.

Fejerskov O, Nyvad B. Dental caries in the aging individual. In: Holm-Pedersen P, Løe H. *Textbook of geriatric dentistry*. Copenhagen: Munksgaard; 1996.

Fejerskov O. Recent advancements in the treatment of root surface caries. *Int Dent J* 1994; 44(2):139-40.

Frank RM. Structural events in the caries process in enamel, cementum, and dentin. *J Dent Res* 1990; 69 Spec No:559-66; discussion 634-6.

Fure S, Zickert I. Salivary conditions and cariogenic microorganisms in 55, 65 and 75-year-old Swedish individuals. *Scand J Dent Res* 1990; 98(3):197-210.

Gao XL, Pan JS, Hsu CY. Laser-fluoride effect on root demineralization. *J Dent Res* 2006; 85(10):919-23.

Geraldo-Martins VR, Tanji EY, Wetter NU, Nogueira RD, Eduardo CP. Intrapulpal temperature during preparation with the Er:YAG laser: an in vitro study. *Photomed Laser Surg* 2005; 23(2):182-6.

Glauche CE, de Freitas PM, Vieira ND Jr, Marques JL. Qualitative microanalysis of ions and ultrastructural changes in dentin exposed to laser irradiation and to metal salts solution. *Lasers Surg Med* 2005; 36(4):334-9.

Gustafsson BE, Quensel CE, Lanke LS, Lundqvist C, Grahnen H, Bonow BE, Krasse B. The Vipeholm dental caries study; the effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontol Scand* 1954; 11(3-4):232-64.

Gustavsen S, Clive JM, Tveit AB. Root caries prevalence in a Norwegian adult dental patient population. *Gerodontology* 1988; 4(5):219-23.

Hajishengallis G, Michalek SM. Current status of a mucosal vaccine against dental caries. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14(1):1-20.

Hamilton IR. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *J Dent Res* 1990; 69 Spec No:660-7; discussion 682-3.

Herkstroter FM, Witjes M, Arends J. Demineralization of human dentine compared with enamel in a pH-cycling apparatus with a constant composition during de- and remineralization periods. *Caries Res* 1991; 25(5):317-22.

Hoppenbrouwers PM, Driessens FC, Borggreven JM. The mineral solubility of human tooth roots. *Arch Oral Biol* 1987; 32(5):319-22.

Hossain M, Kimura Y, Nakamura Y, Yamada Y, Kinoshita JI, Matsumoto K. A study on acquired acid resistance of enamel and dentin irradiated by Er,Cr:YSGG laser. *J Clin Laser Med Surg* 2001; 19(3):159-63.

Hossain M, Nakamura Y, Kimura Y, Yamada Y, Ito M, Matsumoto K. Caries-preventive effect of Er:YAG laser irradiation with or without water mist. *J Clin Laser Med Surg* 2000; 18(2):61-5.

Hossain M, Nakamura Y, Yamada Y, Kimura Y, Matsumoto N, Matsumoto K. Effects of Er,Cr:YSGG laser irradiation in human enamel and dentin: ablation and morphological studies. *J Clin Laser Med Surg* 1999; 17(4):155-9.

Hsu CY, Jordan TH, Dederich DN, Wefel JS. Effects of low-energy CO₂ laser irradiation and organic matrix on inhibition of enamel demineralization. *J Dent Res* 2000; 79(9):1723-30.

IBGE. Disponível em: <http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/webservice/> [2010].

Joshi A, Douglass CW, Jette A, Feldman H. The distribution of root caries in community-dwelling elders in New England. *J Public Health Dent* 1994; 54(1):15-23.

Jenkinson HF, Lamont RJ. Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8(2):175-200.

Kantola S. Laser-induced effects on tooth structure. IV. A study of changes in the calcium and phosphorus contents in dentine by electron probe microanalysis. *Acta Odontol Scand* 1972; 30(4):463-74.

Kantorowitz Z, Featherstone JD, Fried D. Caries prevention by CO₂ laser treatment: dependency on the number of pulses used. *J Am Dent Assoc* 1998; 129(5):585-91.

Katz RV. Assessing root caries in populations: the evolution of root caries index. *J Public Health Dent* 1980; 40(1):7-16.

Keltjens H, Shaeken T, van der Hoeven H. Preventive aspects of root caries. *Int Dent J* 1993; 43(2):143-8.

Kidd EA. Root caries. *Dent Update* 1989; 16(3):93-100.

- Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res* 2004; 83 Spec No C:C35-8.
- Lepri CP, Geraldo-Martins VR, Palma-Dibb RG. Influence of laser irradiation on root caries prevention. AADR 39th Annual Meeting 2010, *J Dent Res*, Issue #89, Abstract #320.
- Li F, Michalek SM, Dasanayake AP, Li Y, Kirk K, Childers NK. Intranasal immunization of humans with *Streptococcus mutans* antigens. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(5):271-7.
- Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986; 50(4):353-80.
- Lynch E, Beighton D. A comparison of primary root caries lesions classified according to colour. *Caries Res* 1994; 28(4):233-9.
- MaccEntee MI, Clark DC, Glick N. Predictors of caries in old age. *Gerodontology* 1993; 10(2):90-7.
- Magalhães AC, Rios D, Machado MA, Da Silva SM, Lizarelli R de F, Bagnato VS, Buzalaf MA. Effect of Nd:YAG irradiation and fluoride application on dentine resistance to erosion in vitro. *Photomed Laser Surg* 2008; 26(6):559-63.
- McCormack SM, Fried D, Featherstone JD, Glena RE, Seka W. Scanning electron microscope observations of CO₂ laser effects on dental enamel. *J Dent Res* 1995; 74(10):1702-8.
- Nammour S, Renneboog-Squilbin C, Nyssen-Behets C. Increased resistance to artificial caries-like lesions in dentin treated with CO₂ laser. *Caries Res* 1992; 26(3):170-5.
- Nelson DG, Jongebloed WL, Featherstone JD. Laser irradiation of human dental enamel and dentine. *N Z Dent J* 1986; 82(369):74-7.
- Nyvad B, Fejerskov O. An ultrastructural study of bacterial invasion and tissue breakdown in human experimental root-surface caries. *J Dent Res* 1990; 69(5):1118-25.

Nyvad B, Fejerskov O. Root surface caries: clinical, histopathological and microbiological features and clinical implications. *Int Dent J* 1982; 32(4):311-26.

Nyvad B, ten Cate JM, Fejerskov O. Arrest of root surface caries in situ. *J Dent Res* 1997; 76(12):1845-53.

Paraskevas S, Danser MM, Timmerman MF, van der Velden U, van der Weijden GA. Amine fluoride/stannous fluoride and incidence of root caries in periodontal maintenance patients. A 2 year evaluation. *J Clin Periodontol* 2004; 31(11):965-71.

Rauci-Neto W, Pécora JD, Palma-Dibb RG. Thermal effects and morphological aspects of human dentin surface irradiated with different frequencies of Er:YAG laser. *Microsc Res Tech* 2012; doi: 10.1002/jemt.22076.

Ravald N, Birkhed D. Factors associated with active and inactive root caries in patients with periodontal disease. *Caries Res* 1991; 25(5):377-84.

Ravald N, Hamp SE, Birkhed D. Long-term evaluation of root surface caries in periodontally treated patients. *J Clin Periodontol* 1986; 13(8):758-67.

Rodrigues JA, Lussi A, Seemann R, Neuhaus KW. Prevention of crown and root caries in adults. *Periodontol* 2000 2011; 55(1):231-49.

Rodrigues LK, Nobre dos Santos M, Pereira D, Assaf AV, Pardi V. Carbon dioxide laser in dental caries prevention. *J Dent* 2004; 32(7):531-40.

Saunders RH, Handelman SL. Effects of hyposalivatory medications on saliva flow rates and dental caries in adult aged 65 and older. *Spec Care Dentist* 1992; 12(3):116-21.

Schüpbach P, Guggenheim B, Lutz F. Histopathology of root surface caries. *J Dent Res* 1990; 69(5):1195-204.

- Schwarz F, Arweiler N, Georg T, Reich E. Desensitizing effects of an Er:YAG laser on hypersensitive dentine. *J Clin Periodontol* 2002; 29(3):211-5.
- Seichter U. Root surface caries: a critical literature review. *J Am Dent Ass* 1987; 115(2):305-10.
- Shu M, Wong L, Miller JH, Sissons CH. Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. *Arch Oral Biol* 2000; 45(1):27-40.
- Sognnaes RF, Stern RH. Laser effect on resistance of human dental enamel to demineralization in vitro. *J South Calif State Dent Assoc* 1965; 33:328-9.
- Sugihara N, Maki Y, Okawa Y, Hosaka M, Matsukubo T, Takaesu Y. Factors associated with root surface caries in elderly. *Bull Tokyo Dent Coll* 2010; 51(1):23-30.
- Sumney DL, Jordan HV. Characterization of bacteria isolated from human root surface carious lesions. *J Dent Res* 1974; 53(2):343-51.
- ten Cate JM, Duijsters PP. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 1982;16(3):201-10.
- ten Cate JM. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odont Scand* 1999; 57(6):325-9.
- Thevadass KP, Pearson GJ, Anstice HM, Davies EH. Method for enhancing the fluoride release of a glass-ionomer cement. *Biomaterials* 1996; 17(4):425-9.
- Thylstrup A, Fejerskov O. *Textbook of Clinical Cariology*. Copenhagen: Munksgaard; 1995.
- Vale GC, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Ten Cate JM, Cury JA. APF and Dentifrice Effect on Root Dentine Demineralization and Biofilm. *J Dent Res* 2011; 90(1):77-81.
- van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 1994; 73(3):672-81.
- Varrela TM. Prevalence and distribution of dental caries in a late medieval population in Finland. *Arch Oral Biol* 1991; 36(8):553-9.

Wallace MC, Retief DH, Bradley EL. The 48-month increment of root caries in an urban population of older adults participating in a preventive dental program. *J Public Health Dent* 1993; 53(3):133-7.

Walls AW, Meurman JH. Approaches to caries prevention and therapy in the elderly. *Adv Dent Res* 2012; 24(2):36-40.

Wefel JS. Root caries histopathology and chemistry. *Am J Dent* 1994; 7(5):261-5.

Ying D, Chuah GK, Hsu CY. Effect of Er:YAG laser and organic matrix on porosity changes in human enamel. *J Dent* 2004; 32(1):41-6.

Zambon JJ, Kasprzak SA. The microbiology and histopathology of human root caries. *Am J Dent* 1995; 8(6):323-8.

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FORP/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

OF.CEP/72/FORP

Ribeirão Preto, 02 de março de 2009.

Prezado Senhor,

Ref.: Processo nº 2009.1.87.58.0
CAAE nº 0009.0.138.000-09

A pedido da Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva, Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa, desta Faculdade, informamos que o referido Comitê em sua 95ª Sessão, realizada em 26 de fevereiro de 2009, **aprovou** o desenvolvimento do Projeto de Pesquisa intitulado **"Emprego do laser para a prevenção de cárie em dentina radicular"**.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria do Comitê, com o formulário preenchido pelo pesquisador responsável, os **Relatórios Parciais** no dia **15 de março de 2010 e 15 de março de 2011** e o **Relatório Final** no dia **15 de março de 2012**.

Atenciosamente,

Luci Rose Nassif Menezes

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa *ad hoc*

Ilmo. Sr.
Pós-Graduando César Penazzo Lepri
Departamento de odontologia Restauradora – FORP/USP

Anexo 2. Declaração do Banco de Dentes da FORP/USP

UNIVERSIDADE E SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
BANCO DE DENTES HUMANOS

DECLARAÇÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Para fins de avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desta Instituição, o Banco de Dentes da FORP – USP compromete-se, mais uma vez, a auxiliar pesquisadores na realização de seus projetos.

Sendo assim, após a aprovação do CEP, nossa contribuição consistirá no oferecimento de **150** (cento e cinquenta) **terceiros molares** a execução do trabalho de pesquisa intitulado "EMPREGO DO LASER PARA PREVENÇÃO DE CÁRIE EM DENTINA RADICULAR" a ser realizado pelo aluno de doutorado Cesar Penazzo Lepri orientado pela **Profa. Dra. Regina Guenka Palma-Dibb**.

Ribeirão Preto, 29 de janeiro de 2009.

Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto
Coordenador Geral
BDH FORP USP

Anexo 3. Artigo enviado para publicação

Editorial Manager® x Nova guia x

www.editorialmanager.com/lims/default.asp

LASERS IN MEDICAL SCIENCE

HOME • LOG OUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: Author Username: cesarlepri

Submissions Being Processed for Author Cesar Penazzo Lepri, DDS, MSc, Doctoral Student

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission View Reference Checking Results Send E-mail		Laser efficiency for root caries prevention associated or not with fluoride	Sep 03, 2012	Sep 03, 2012	Submitted

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu