

FERNANDO SEISHIM HANASHIRO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DO LASER DE CO₂, ASSOCIADO
OU NÃO À APLICAÇÃO TÓPICA DE FLÚOR, NA REDUÇÃO DA
DESMINERALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES RADICULARES**

São Paulo

2009

Fernando Seishim Hanashiro

**Avaliação *in vitro* do efeito do laser de CO_2 , associado ou não à
aplicação tópica de flúor, na redução da desmineralização de
superfícies radiculares**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São Paulo,
para obter o título de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Odontologia

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Prof. Dr. Michel Nicolau
Youssef

São Paulo

2009

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

Hanashiro, Fernando Seishim

Avaliação *in vitro* do efeito do laser de CO_2 , associado ou não à aplicação tópica de flúor, na redução da desmineralização de superfícies radiculares / Fernando Seishim Hanashiro; orientador Michel Nicolau Youssef. -- São Paulo, 2009.

67p. : tab., fig.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Laser (Odontologia) – Desmineralização dentinária – Efeitos 2. Dentística

CDD 617.675
BLACK D2

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Hanashiro FS. Avaliação *in vitro* do efeito do laser de CO₂, associado ou não à aplicação tópica de flúor, na redução da desmineralização de superfícies radiculares [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009

São Paulo, / /2009

Banca Examinadora

1)Prof(a). Dr(a). _____

Titulação _____

Julgamento _____ Assinatura _____

2)Prof(a). Dr(a). _____

Titulação _____

Julgamento _____ Assinatura _____

3)Prof(a). Dr(a). _____

Titulação _____

Julgamento _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Osvaldo **Kiyomaro Hanashiro**, um exemplo de honestidade e coragem. Você me ensinou a ser forte quando precisar, mas, também me ensinou o quão importante é a família.

A minha mãe **Sadako Hanashiro**, mulher muito importante da minha vida, sempre protegeu a família e cuidou para que nos mantivéssemos juntos.

Ao meu irmão **Henrique** e as minhas irmãs **Josye, Renata e Patricia**, obrigado pelos momentos que passamos juntos, pelo aprendizado, e pela paciência que tiveram comigo todos esses anos.

A minha sogra **Ilda**, por toda força, cuidado e respeito que teve comigo todos esses anos.

Aos meus cunhados **Ricardo, Eric, Márcia e Mary**, por fazerem parte de minha família.

Aos meus sobrinhos **Naomi e Rafael**, por deixar a vida de todos mais alegre e feliz.

A minha filha e sempre princesinha **Julia Ery**, por fazer meu coração pular de alegria e felicidade, a cada dia e a cada sorriso.

E, por fim, mas, não por última, ao meu amor, **Sandra**, por completar a minha vida com carinho, apoio, compreensão, incentivo e muito amor! Muito obrigado por fazer parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. **Michel Nicolau Youssef**, por sempre guiar e orientar meus passos, pelo incentivo a procurar soluções de problemas. Obrigado pelos ensinamentos e oportunidades que me proporcionou.

À Profa. Dra. **Wanessa Christine de Souza Zaroni**, pela sua ajuda, amizade e ensinamentos recebidos. Obrigado pela força e incentivo, e pela disponibilidade em ajudar em todos os momentos

À Profa. Dra. **Miriam Lacalle Turbino**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Dentística, pelos ensinamentos, orientação e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudo durante o curso de mestrado.

À Universidade de São Paulo, representada pela Reitora Profa. Dra. Suely Vilela.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, representada por seu Diretor, Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo

Ao Prof. Dr. Reinaldo Brito Dias, Coordenador Geral da Pós-Graduação da FOU SP

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Bombana, Chefe do Departamento de Dentística e Endodontia da FOU SP e a todos os docentes pela competência e por todos os ensinamentos recebidos.

Às professoras Patricia Freitas, Ana Cecilia, pela amizade e pela ajuda recebida.

À Profa. Dra. Margareth Oda, pelo incentivo e amizade.

À Soninha, funcionária do Departamento de Dentística, por estar sempre pronta para me ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Dentística, David, Ana, Aldo e Selma, pela ajuda e atenção demonstradas.

Às Funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação, Kátia, Nair e Alessandra, pela paciência e ajuda durante o curso de mestrado.

À Funcionária Glauci, do Serviço de Documentação Odontológica, pela ajuda essencial com o trabalho.

Aos meus amigos do curso de Pós-Graduação, Airton, Amanda, Carol, Andréa, Angela de Caroli, Angela Vigorito, Angela Shimaoka, Bruna, Camila Guglielmi, Camilinha, Débora, Denis, Ellen, Fredy, Cidão, Gisela, Juliana, Leila, Letícia, Lucia, Marinão, Sergio (BOI), Sheia, Simone, Taciana, Tais, Thais, Washington e Yuri, muito obrigado por todo esse tempo e amizade de todos vocês.

À minha colega Alessandra, pela ajuda essencial com o QLF.

Aos meus colegas de turma, e de trabalho, Daniel e Jan, obrigado pela força.

À minha amiga Juliana Yuki, obrigado pelo seu incentivo e amizade.

A todas as pessoas que contribuíram na elaboração deste trabalho.

Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.

Dalai Lama

Hanashiro FS. Avaliação *in vitro* do efeito do laser de CO₂, associado ou não à aplicação tópica de flúor, na redução da desmineralização de superfícies radiculares [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009

RESUMO

Estudos têm mostrado que a dentina pode ser modificada pelo laser pulsado de CO₂ tornando-a um substrato mais ácido-resistente. Este estudo *in vitro* se propôs a avaliar o efeito do laser de CO₂, associado ou não à aplicação tópica de flúor, na redução da desmineralização de superfícies radiculares humanas, utilizando um laser pulsado de comprimento de onda 10,6 µm. Cinquenta superfícies radiculares humanas obtidas de vinte e cinco terceiros molares foram aleatoriamente divididas em 5 grupos (n=10) com os seguintes tratamentos de superfície: G1 – Nenhum tratamento (controle negativo), G2 – Flúor Fosfato Acidulado (FFA- controle positivo), G3 – Laser 4,0 J/cm², G4 – Laser 4,0 J/cm² + FFA e G5 – FFA + Laser 4,0 J/cm². Após o tratamento da superfície, os espécimes foram submetidos a 7 dias de ciclagem de pH, permanecendo diariamente em soluções desmineralizadora e remineralizadora por 3 h e 21 h, respectivamente. Após o desafio ácido, os espécimes foram avaliados para determinar a perda mineral por meio do QLF. Pode-se concluir que o laser de CO₂, associado ou não à aplicação tópica de flúor, é capaz de inibir a desmineralização da superfície radicular, contudo não se observa efeito sinérgico com a associação da irradiação com laser e tratamento com flúor.

Palavras-Chave: Dentina radicular; Ciclagem de pH; Fluorescência; Laser de CO₂

Hanashiro FS. In vitro evaluation of the effect of CO₂ laser, associated or not the topical application of fluoride in reducing the demineralization of root surfaces [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009

ABSTRACT

Studies have shown that dentine can be modified by pulsed CO₂ laser to form a more acid-resistant substrate. This *in vitro* research aimed to evaluate the effect of CO₂ laser, associated or not the topical application of fluoride in reducing demineralization of human root surfaces using a pulsed laser of wavelength 10.6 μm. Fifty human root surfaces obtained from twenty-five third molars were randomly divided into 5 groups (n=10) with the following surface treatments: G1 - No treatment (negative control), G2 - acidulated Phosphate Fluoride (FFA-positive control), G3 - Laser 4.0 J/cm², G4 - Laser 4.0 J/cm² + FFA and G5 - FFA + Laser 4.0 J/cm². After surface treatment, specimens were subjected to 7 days of cycling the pH, remaining daily remineralizadora and demineralized in solutions for 21 h and 3 h, respectively. After acid challenge, the specimens were evaluated to determine the mineral loss through QLF. It can be concluded that the CO₂ laser, with or without application of topical fluoride is able to inhibit the demineralization of root surface, however do not observed synergistic effect with the combination of laser irradiation and fluoride treatment.

Keywords: Root dentin; pH cycling; Fluorescence; CO₂ laser

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
3 PROPOSIÇÃO.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5 RESULTADOS.....	45
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXO.....	65

1 INTRODUÇÃO

A média de idade da população brasileira vem aumentando nas últimas décadas (IBGE, 2009), tendo a expectativa de vida, passado de 66,5 anos em 1990, para 72,7 anos em 2008 (IBGE, 2009). Tal fato, associado a uma crescente difusão de conceitos de Odontologia Preventiva entre profissionais e pacientes, tem como consequência a manutenção de um maior número de elementos dentais em adultos e idosos.

Devido à presença dos elementos dentais por um período maior de tempo, a cárie radicular apresenta-se como doença mais freqüente que atinge a população idosa. A exposição da superfície radicular, presença de biofilme patogênico, dieta cariogênica e controle de placa deficiente, aumentam o risco de lesões cariosas radiculares (HAWKINS, 1999; GRIFFIN et al., 2004).

As diferenças da estrutura e composição química dos tecidos dentais, favorecem o aparecimento de lesões cariosas radiculares frente a um mesmo desafio cariogênico, devido ao pH crítico da dentina ser de 6,7, (HOPPENBROUWERS; DRIESSENS; BORGGREVEN, 1987) relativamente mais alto que o pH crítico do esmalte de 5,5.

Geralmente essas lesões apresentam-se em áreas de difícil acesso e controle de umidade, dificultando o tratamento curativo. Portanto, fica valorizado ainda mais o tratamento preventivo da doença cárie.

Um dos métodos preventivos é a utilização de fluoretos para aumentar a resistência à desmineralização do tecido dental, tendo como vantagens, seu baixo custo e facilidade de manipulação.

Por outro lado, outros métodos promissores, como o uso do laser, mais especificamente o laser de CO₂, devido ao seu comprimento de onda ($\lambda=10,6\mu\text{m}$) ser altamente absorvido pelo tecido dental, pode ser utilizado para aumentar a resistência à desmineralização da dentina e/ou cemento (FEATHERSTONE et al., 1998; KANTOROWITZ; FEATHERSTONE; FRIED, 1998; SOUZA-ZARONI, 2007).

Adicionalmente, assim como ocorre para o esmalte, a literatura relata a possibilidade de associação de ambos os tratamentos (flúor e laser) para potencializar a resistência dos tecidos radiculares dentais ao desafio cariogênico (GAO; PAN; HSU, 2006). Entretanto, inúmeras são as possibilidades de condições de irradiação do laser de CO₂, pois mesmo trabalhando com o mesmo comprimento de onda (10,6 μm) e mesma densidade de energia, se houver variação na duração do pulso, número de pulsos sobrepostos e taxa de repetição, a resposta do tecido dental à energia depositada sobre ele pode ser diferente.

Neste contexto, podemos observar que são escassos estudos que tenham avaliado o efeito do laser de CO₂ com comprimento de onda 10,6 μm e duração de pulso de 10ms sobre a prevenção de lesões de cárie de superfície radicular, bem como o possível efeito sinérgico que este laser pode exercer associado à aplicação tópica de flúor sobre tais superfícies.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta Revisão de literatura, serão abordados os seguintes temas:

2.1 Cárie Radicular

2.2 Emprego do laser de CO₂ na prevenção

2.3 Métodos de quantificação de Cárie

Considerando a grande quantidade de trabalhos referentes a estes temas, optou-se nesta revisão, pela apresentação dos autores de maneira agregada segundo assunto, para tornar a leitura mais agradável.

2.1 Cárie Radicular

A cárie é uma doença relacionada de natureza infecciosa, multifatorial e dinâmica. Depende da interação de quatro fatores: biofilme patogênico, susceptibilidade do hospedeiro, dieta cariogênica e o tempo. E a cárie radicular é uma doença relacionada com a população adulta e idosa, devido a necessidade da manutenção do elemento dental e subsequente exposição da superfície radicular ao ambiente bucal.

Seu desenvolvimento se dá preferencialmente próximo a junção amelo-cementária (FEJERSKOV, 1994; WEFEL, 1994), por ser um sítio de maior retenção de biofilme patogênico. Sua etiologia é semelhante à cárie coronária, mas, devido a suas diferenças na estrutura e composição química, sua susceptibilidade é maior.

Seu pH crítico, está em torno de 6,0 a 6,7 (ELIASSON; KRASSE; SOREMARK, 1992; WEFEL, 1994), relativamente maior que o pH crítico do esmalte que é em torno de 5,2 a 5,7. Essa diferença faz com que em um mesmo desafio cariogênico, ocorra uma maior desmineralização da superfície radicular em relação à superfície coronária. Podendo uma dieta sem altas concentrações de carboidratos pode ser suficiente cariogênica para a superfície radicular se associada a um biofilme específico (KELTJENS; SCHAEKEN; VAN DER HOEVEN, 1993).

A Microbiota da cárie de superfície radicular é menos conhecida do que a microbiota da cárie de esmalte (ZAMBON; KASPRZAK, 1995), por este motivo, menos informação está disponível. A literatura relata que a espécie *Actinomyces* é o

agente etiológico da cárie radicular, principalmente o *A. viscosus* e *A. naeslundii* (ELLEN; BANTING; FILLERY, 1985; VAN HOUTE et al., 1990). Entretanto, segundo Van Houte et al. (1990), não há correlação positiva entre o aumento de *Actinomyces* e a presença de cárie radicular, pois a quantidade desse microorganismos sempre foi elevada na superfície radicular, independente do risco e atividade de cárie, levando à conclusão, que não possuem necessariamente potencial de desenvolvimento de cárie em humanos. Sua baixa ação na etiologia da cárie radicular pode ser atribuída a sua baixa acidogenicidade (VAN HOUTE et al., 1990), apesar da mesma possuir a habilidade de induzir cárie radicular em animais, quando utilizada junto a dieta rica em carboidratos. Segundo Shen, Samaranayake e Yip (2004), *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces israelii* podem ser considerados agentes primários de cárie radiculares.

A histopatologia da cárie de superfície radicular mostra uma precoce penetração bacteriana no cimento e na dentina (SEICHTER, 1987). As bactérias penetram através dos espaços mais superficiais e atingindo as camadas incrementais do cimento, por onde promovem desmineralização e desorganização (FURSETH, 1971; SCHUPBACH; GUGGENHEIM; LUTZ, 1990). Assim chegam à dentina, colonizando as fibras colágenas e provavelmente, sendo responsáveis pelo rompimento das mesmas. . A invasão bacteriana pode ser iniciada diretamente na dentina, nos casos onde o cimento é inexistente, principalmente após a execução de tratamento periodontal (FEJERSKOV, 1994; WEFEL, 1994). Independente do tipo de tecido envolvido, para que haja degradação enzimática, ou até mesmo remoção mecânica da parte orgânica, é preciso que ocorra uma prévia desmineralização (WEFEL, 1994).

A evolução da cárie de superfície radicular é lenta, apesar da solubilidade do cemento e da dentina ser alta e da maior penetração bacteriana (SEICHTER, 1987; FEJERSKOV, 1994). Esse fato pode ser atribuído ao menor número de túbulos dentinários na dentina radicular, e por sua maior mineralização, em função da idade. Outro fator que diminui a progressão da cárie radicular é que o biofilme bacteriano formado sobre a superfície radicular é mais delgado, o que facilita redeposição de minerais pela saliva (NYVAD; FEJERSKOV, 1982)

O processo físico-químico de desmineralização e remineralização que ocorre entre o esmalte e o ambiente oral é semelhante à superfície radicular. No entanto, devido a superfície radicular possuir um tecido mais poroso, esse intercâmbio iônico é mais intenso, e a depender das condições de pH, pode favorecer ou não a perda de minerais por parte da raiz. A subsuperfície radicular é onde acontece a perda de minerais, mas, a camada superficial apresenta uma maior mineralização. Segundo Nyvad, Ten Cate e Fejerskov (1997), não há diferenças na mineralização entre a superfície exposta ou a não exposta à cavidade oral, porém, a superfície que tiveram contato com o meio bucal, mostra um padrão diferente de distribuição mineral, havendo uma concentração maior em sua superfície. Isso demonstra que a superfície que não entrou em contato com o meio bucal é mais reativa, como também mais suscetível ao desafio cariogênico (HALS; SELVIG, 1977).

2.2 Emprego do laser de CO₂ na prevenção

As propriedades ópticas do tecido dependem principalmente de sua composição química, a dentina possuindo 47% de conteúdo mineral, e o esmalte em torno de 80% (FEATHERSTONE, 1994), influenciando na interação do laser (WIGDOR et al., 1995; ZUERLEIN; FRIED; FEATHERSTONE, 1999). Os tecidos dentais possuem alta absorção no comprimento de onda entre 9 µm a 11 µm, característico dos lasers de CO₂, pela hidroxiapatita.

Os primeiros pesquisadores a estudar o emprego do laser de CO₂ para o tratamento preventivo da cárie dental foram Stern, Vhal e Sognnaes (1972), os quais relataram uma diminuição da solubilidade do esmalte dental, através da fusão e selamento dos poros do esmalte e das irregularidades da superfície.

Uma das explicações esta relacionada a diminuição da permeabilidade do esmalte aos agentes químicos, causada pela fusão da superfície do esmalte. Entretanto essa hipótese parece ser improvável, considerando que o único estudo que executou testes de permeabilidade foi realizado por Borggreven, Van Dijk e Driessens (1980), encontraram que a permeabilidade do esmalte aumentou ao invés de diminuí-la. Tais autores sugeriram que a resistência do esmalte irradiado à desmineralização, pode ser devido às mudanças químicas, como a perda de matéria orgânica e do carbonato.

Outra explicação esta focada na combinação da permeabilidade reduzida do esmalte com a redução de sua solubilidade, provocada pelo derretimento, fusão e

recristalização dos cristais de esmalte, selando a superfície do mesmo (NELSON; JONGEBLOED; FEATHERSTONE, 1986; NELSON et al., 1986; NELSON et al., 1987). Por outro lado, uma análise da secção transversal e microscopia eletrônica de transmissão revelou que o derretimento não era homogêneo, e ocorria em áreas limitadas (FERREIRA et al., 1989; POGREL; MUFF; MARSHALL, 1993). Dessa forma, parece que o derretimento e fusão não são necessários para aumentar a resistência do esmalte à desmineralização. De acordo com Fowler e Kuroda (1986) e, as mudanças químicas induzidas pelo laser resultam do aquecimento localizado (SATO, 1983). Assim esses pesquisadores, embasados em estudos prévios, onde o esmalte foi progressivamente aquecido em fornos convencionais, correlacionaram as principais mudanças induzidas do esmalte pela elevação de temperatura com os prováveis efeitos na solubilidade de mineral.

Segundo os autores, o aquecimento entre 100°C e 650°C promove diminuição do conteúdo de água e de carbonato, sendo que a aproximadamente 350°C ocorre a decomposição protéica. De 650°C a 1100°C ocorre a recristalização térmica e com o aumento do tamanho dos cristais de hidroxiapatita, formação de fosfato β -tricálcico, perda de água e carbonato. A partir de 1100°C, ocorre a formação de fosfato tetracálcico e à conversão de fosfato β -tricálcico em fosfato α -tricálcico, compostos substancialmente mais solúveis em ácido que o fosfato β -tricálcico, esmalte dental e hidroxiapatita e, portanto podem aumentar a solubilidade da superfície do mineral.

Neste contexto, é possível concluir que ainda se desconhece as exatas razões que levam a redução de lesões cariosas em esmalte com a utilização do laser de CO₂. Contudo, já está comprovado na literatura que o laser de CO₂, com

seus diferentes comprimento de onda é capaz de reduzir o processo de desmineralização.

Os lasers de CO₂ estão incluídos dentro do campo de radiação infravermelha, e que apresentam mais de 100 diferentes emissões de laser com comprimento de onda entre 9 a 11 μm, sendo que os quatro principais comprimentos de onda utilizados são: 9,3 μm, 9,6 μm, 10,3 μm e 10,6 μm. Dentre eles, os mais indicados por serem mais bem absorvidos pelos tecidos duros dentais, são o 9,3 μm e o 9,6 μm. Entretanto, até o aumento, não existe laser comercial disponível que possa reproduzir tais condições. (FEATHERSTONE, 2000), de modo que os lasers que são estudados com esses comprimentos de onda são protótipos. Assim sendo, vários estudos têm empregado o comprimento de onda de 10,6 μm que esta presente na maioria de aparelhos disponíveis no mercado.

Quanto aos comprimentos de onda, Nelson et al. (1986) procuraram investigar quais os comprimentos de onda mais indicados à redução de lesões de cárie in vitro. Para tanto, através de um laser TEA-CO₂ (TEA – Transversely excited atmospheric pressure), com comprimentos de onda de 9,3 μm, 9,6 μm, 10,3 μm e 10,6 μm, e densidades de energia de 10-50 J/cm². Após a irradiação, as amostras foram imersas em solução desmineralizadora (pH 5,0) durante 14 dias para formar as lesões de cárie. A análise de microdureza demonstrou que as densidades de 9,3 μm e 10,6 μm foram os mais efetivos na redução de cárie. Lesões significativamente mais rasas e menos desmineralizadas foram encontradas nas amostras irradiadas com $\lambda=9,3 \mu\text{m}$, chegando a reduzir em 50% a desmineralização quando comparadas às do grupo controle.

No ano seguinte, o estudo de Nelson et al. (1987), utilizando as mesmas densidades de energia, e os mesmos comprimentos de onda, avaliou a morfologia, a cristalografia da superfície de esmalte e o aspecto histológico das lesões de cárie. Adicionalmente a temperatura foi avaliada durante a irradiação com a densidade de energia de 50 J/cm². Os picos de temperatura foram de 1050±40°C, 980±30°C, 835±30°C e 810±30°C para os comprimentos de onda de 9,3 µm, 9,6 µm, 10,3 µm e 10,6 µm, respectivamente, e a condutibilidade ficou limitada de 10 a 20 µm sob a superfície derretida. Sob a microscopia de luz refletida, o λ=10,6 µm não causou qualquer rugosidade significativa na superfície; em contrapartida, 9,6 µm e 9,3 µm produziram uma área bem mais rugosa na parte central da irradiada.

Os efeitos do laser de CO₂, com diferentes comprimentos de onda, sobre o esmalte também foram avaliadas com o auxílio de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) (MCCORMACK et al., 1995). Espécimes de esmalte bovino e humano foram irradiados com os comprimentos de onda de 9,3 µm, 9,6 µm, 10,3 µm e 10,6 µm em modo pulsado e densidades de energia de 2, 5, 10 e 20 J/cm² por pulso. O λ=10,6 µm com densidades de energia de 5 ou 10 J/cm² não produziu derretimento do esmalte e fusão dos cristais da superfície, porém promoveu a formação de fendas superficiais distintas associadas ao estresse térmico pela interação com o laser. Segundo os autores, este comprimento de onda pode ter alterado a composição química e estrutural dos cristais de esmalte. Por sua vez, o calor gerado pelos comprimentos de onda de 9,3 µm o, 9,6 µm e, em menor extensão 10,3 µm, foi suficiente para causar rápido derretimento da superfície e fusão dos cristais de esmalte em densidades tão baixas quanto 5 J/cm².

Featherstone et al. (1998) procuraram determinar os parâmetros ótimos da irradiação com laser de CO₂ que efetivamente potencializariam a redução de cárie

no esmalte. Para tanto, coroas de molares e pré-molares foram irradiados com um dos quatro comprimentos de onda: 9,3 μm , 9,6 μm , 10,3 μm e 10,6 μm e densidades de energia de 1 a 12,5 J/cm^2 por pulsos. Após a irradiação, as amostras foram submetidas ao processo de ciclagem de pH realizado durante 9 dias (soluções: desmineralizadora pH 4,3 e remineralizadora pH 7,0). A análise de microdureza revelou que as máximas inibições de cárie foram de 85%, 73%, 71% e 68% para os comprimentos de onda 10,6 μm , 10,3 μm , 9,6 μm e 9,3 μm , empregando as densidades de energia de 12,5 J/cm^2 , 10 J/cm^2 , 5 J/cm^2 e 1 J/cm^2 , respectivamente. Estes resultados, segundo os autores, foram comparáveis com a redução de cárie produzida por tratamentos diários com dentifrícios fluoretados no mesmo modelo *in vitro*.

Também Kantorowitz, Featherstone e Fried (1998) conduziram um estudo com o objetivo de avaliar o potencial preventivo de várias condições de irradiação, explorar o efeito do número de pulsos usados e correlacionar a redução de cárie com as mudanças na superfície do esmalte por meio da análise de microdureza e da microscopia eletrônica de varredura. Para os comprimentos de onda 9,6 μm e 10,6 μm , a densidade de energia foi de 5 J/cm^2 e 12 J/cm^2 por pulso, respectivamente. Após a irradiação, uma ciclagem de pH foi realizada durante 9 dias (soluções: desmineralizadora pH 4,3 e remineralizadora pH 7,0). A microscopia eletrônica de varredura revelou a presença de alterações morfológicas na maior parte das superfícies irradiadas com o $\lambda = 9,6 \mu\text{m}$, as quais pareceram estar fundidas e compostas por novos cristais maiores que os do esmalte normal. Por sua vez, as áreas tratadas com o $\lambda = 10,6 \mu\text{m}$ mostraram pouca ou nenhuma mudança morfológica, com poucos pontos de fusão, recristalização ou expulsão do esmalte. Na análise de microdureza, todos os grupos tratados com laser apresentaram lesões

de cárie significativamente menores quando comparadas às do grupo controle, chegando a promover de 48% a 87% e de 28% a 59% de inibição de cárie para os comprimentos de onda 10,6 μm e 9,6 μm , respectivamente. Segundo os autores, os melhores resultados obtidos com o $\lambda = 10,6 \mu\text{m}$ indicaram que o derretimento da superfície e a fusão não são necessários para aumentar a resistência do esmalte ao desafio ácido.

Em relação à dentina, alguns autores (KANTOLA, 1972; NELSON; JONGEBLOED; FEATHERSTONE, 1986; NAMMOUR; RENNEBOOG-SQUILBIN; NYSSSEN-BEHETS, 1992) relataram a ocorrência de redução 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) avaliou a susceptibilidade da dentina irradiada por diferentes tipos de laser, inclusive o laser de CO_2 com comprimento de onda 10,6 μm , à formação de lesões de cárie artificiais, verificando que a irradiação da dentina poderia ser usada para aumentar o conteúdo mineral da mesma através da remoção preferencial da água e proteínas inerentes a este tecido. Os pesquisadores sugeriram que a irradiação com laser de CO_2 em modo contínuo e densidade de potência de 0,6 mW/cm^2 promoveu a recristalização da dentina, crescimento do tamanho dos cristais de hidroxiapatita, e formação de uma dentina de menor grau de cristalinidade, estruturalmente modificada, que se assemelhava à estrutura cristalina da hidroxiapatita do esmalte normal. Nelson, Longebloed e Featherstone (1986) mostraram a ocorrência de fusão e derretimento em dentina radicular irradiada com o laser de CO_2 com comprimento de onda 9,3 μm e densidade de energia de 50 J/cm^2 , alterações estas que foram relacionadas à porcentagem de redução da formação de lesões de cárie de 50% encontrada neste estudo. Nammour,

Renneboog-Squilbin e Nyssen-Behets (1992) encontraram bons resultados de redução de cárie em dentina irradiada com laser de CO₂ com o comprimento de onda 10,6 µm em modo contínuo e utilizando densidades de energia de 280 a 715 J/cm². Após a irradiação, as amostras foram imersas por 4 semanas em um gel contendo 0,05 mol/L de ácido láctico (pH 4,5). Os autores verificaram a presença de selamento da camada superficial da dentina, a qual dificultou a difusão de ácidos para a dentina sadia subjacente e reduziu significativamente a extensão da lesão de cárie formada. Entretanto, neste estudo, a irradiação a laser não selou completamente a abertura dos túbulos dentinários, possibilitando a difusão dos ácidos pela grande superfície de crateras criada durante o processo de irradiação.

No entanto, considerando que o conteúdo mineral da dentina é muito menor (em torno de 47%) que do esmalte (em torno de 85%) e ela possui características estruturais diferentes (FEATHERSTONE, 1994), o que também interfere na sua interação com a luz laser (WIGDOR et al., 1995), 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).

Desta forma, apenas o estudo de Gao, Pan e Hsu (2006), o qual empregou o laser de CO₂ ($\lambda=10,6$ µm) com densidade de energia de 1,14 J/cm² para irradiação de espécimes de superfície radicular, parece ter empregado parâmetro de irradiação coerente com as características do substrato estudado. Tais autores verificaram através de microscopia de luz polarizada que as profundidades das lesões de cárie radicular formadas após irradiação com laser de CO₂ eram menores do que as do grupo controle e semelhantes as do grupo que utilizou gel de fluoreto de sódio a 2,0%. Adicionalmente, os autores observaram um efeito sinérgico do uso combinado da irradiação laser e aplicação de gel fluoretado, o qual apresentou profundidades

de lesão estatisticamente menores do que as do grupo que utilizou somente o laser ou somente o gel fluoretado, e demonstrou uma taxa de inibição de desmineralização de 84,5%, enquanto que o grupo que utilizou somente o laser e o que utilizou somente o gel fluoretado, demonstrou taxa de inibição de 29,8% e 30,8%, respectivamente.

Habelitz et al.(2008), utilizando um laser de CO₂ de comprimento de onda de 9,3 μm, com densidade de energia de 0,5, 0,75, 1,0 e 1,5 J/cm², relatam um aumento nas propriedades nanomecânicas, em seu módulo de dureza quando utilizada densidade de 1,5 J/cm². Mas, esse aumento não significou um maior aumento na inibição de desmineralização.

2.3 Métodos de quantificação de Cárie

O estudo de novas terapias para a prevenção da cárie exige que as lesões desenvolvidas e pequenas alterações no conteúdo mineral da estrutura possam ser quantificadas. A quantificação das lesões pode ser feita tanto com relação à extensão de tecido já afetado, como com relação à perda mineral (ANGMAR; CARLSTROM; GLAS, 1963; ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED, 1980; THEUNS et al., 1983)

Em estudos *in vitro*, a utilização das técnicas de microrradiografia em corte transversal, microdureza em corte transversal, análises químicas da dissolução de cálcio e fósforo, bombardeamento por elétrons e microscopia de luz polarizada têm sido considerados métodos de referência para esse tipo de medida (ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED, 1980; ARENDS; TEN BOSCH, 1992).

Com intuito de possibilitar uma avaliação quantitativa das lesões também *in vivo*, grande atenção tem sido dedicada ao desenvolvimento de métodos não destrutivos. Esses métodos se baseiam fundamentalmente na análise das propriedades ópticas alteradas nos tecidos cariados e com alguns deles é possível uma correlação com o conteúdo mineral. Entre os vários métodos que têm sido estudados, tomografia por coerência óptica, espalhamento por luz e quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF), este último é o que se encontra em estágio mais avançado de desenvolvimento e para o qual já existe inclusive um equipamento disponível para o uso clínico.

2.3.1 microscopia luz polarizada

A estrutura mineral do esmalte é composta de cristais de hidroxiapatita, organizados em primas que estendem da junção amelo-dentinária até a superfície. Esses cristais apresentam propriedade de birrefringência e, portanto, a estrutura apresenta dois índices de refração. Quando um feixe de luz polarizada atravessa a estrutura ele é dividido em dois feixes de velocidades diferentes. No esmalte humano o sinal negativo de birrefringência é dado arbitrariamente para o feixe mais lento que vibra em ângulo perpendicular à extensão dos prismas. Sendo assim, em um corte longitudinal, o esmalte apresenta uma birrefringência intrínseca negativa. No esmalte cariado ocorre um aumento dos poros e do espaço inter-cristais, que dá origem a um segundo tipo de birrefringência, que é positiva em relação à orientação dos prismas. Essa birrefringência é produzida quando os poros formados são preenchidos por um meio de índice de refração diferente dos cristais de apatita ($n=1,62$). Portanto, quanto maior for a diferença entre o índice de refração dos cristais e do meio em que as fatias de esmalte são embebidas, maior será a birrefringência positiva formada. Da mesma forma, quanto maior for a desmineralização e o volume dos poros, maior será a birrefringência positiva (SILVERSTONE, 1973). Nas amostras embebidas em água ($n=1,33$) um bom contraste entre o esmalte sadio e o cariado pode ser observado (SILVERSTONE; HICKS; FEATHERSTONE, 1988).

A possibilidade de utilização da microscopia de luz polarizada para a observação do esmalte dental sadio e cariado é há muito tempo conhecida. Os

estudos realizados na metade do século passado utilizando essa técnica permitiram a caracterização histológica detalhada das alterações do esmalte cariado, que são até hoje utilizadas em cariologia (HOLMEN et al., 1985). A vantagem da observação em microscópio de luz polarizada é que ela permite uma diferenciação mais clara das várias zonas de uma lesão. Além disso, essa técnica não é útil apenas para descrições qualitativas do esmalte cariado, mas também para a análise quantitativa, fornecendo informações indiretas sobre a estrutura (WEFEL; HARLESS, 1984). Apesar da quantificação mineral não ser possível, sem que as lâminas sejam embebidas em soluções de diferentes índices de refração, a imagem mostra um forte contraste entre as quatro zonas da lesão e portanto permite que ela seja medida em sua completa extensão. Por outro lado, a imagem de uma mesma lesão observada por microrradiografia revela apenas o corpo da lesão.

A medida de profundidade de lesão através de microscopia de luz polarizada tem sido utilizada em diversos estudos avaliando o efeito do flúor tópico na progressão de cárie, e também como método de referência para avaliação de novos métodos de quantificação de lesões (ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED, 1980; HICKS; SILVERSTONE, 1984; WEFEL; HARLESS, 1984; LEGEROS, 1990; ARENDS; TEN BOSCH, 1992; HARA et al., 2003; MENDES; NICOLAU; DUARTE, 2003; HARA et al., 2005).

2.3.2 Quantificação da fluorescência Induzida por luz (QLF)

A necessidade de uma Odontologia cada vez mais conservadora e menos restauradora motivou a comunidade científica a buscar novos métodos de detecção de cárie que permitissem não somente a identificação de lesões, mas também a quantificação de sua severidade. Entre os diversos métodos ópticos, recentemente estudados, grande atenção tem sido dada à quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF). Isto porque além de permitir um diagnóstico de lesões em estágio inicial, os valores de redução de radiância da fluorescência também apresentam um alto grau de correlação com a perda de volume mineral observada em microradiografia (BENEDICT, 1928; KONIG; SCHNECKENBURGER; HIBST, 1999; BUCHALLA, 2005). A quantificação da perda mineral através da técnica de QLF é feita de maneira não-destrutiva e permite o monitoramento de lesões (perda e ganho mineral) ao longo do tempo, o que é essencial para se determinar o grau de atividade da lesão e um correto plano de tratamento (ALFANO; YAO, 1981). Sendo assim, o método é bastante promissor do ponto de vista clínico e pode fornecer dados quantitativos para as decisões clínicas de intervenção ou acompanhamento das lesões.

Também do ponto de vista do uso *in vitro* o método apresenta vantagens, pois permite a avaliação rápida de novos métodos preventivos de cárie, encurtando assim o tempo necessário para que eles possam ser testados *in situ* ou *in vivo*. A observação mais rápida do que nos métodos tradicionais é possível, pois longos procedimentos para obtenção de fatias dentais finas não são necessários e a mesma amostra pode ser medida várias vezes no decorrer do tempo e da aplicação

da terapia. O método QLF se baseia na propriedade intrínseca da estrutura dental de apresentar fluorescência quando iluminada por fonte de luz ultravioleta e visível na região do azul-verde e vermelho do espectro eletromagnético (SPITZER; TEN BOSCH, 1977; MUJAT et al., 2003);. Uma boa diferenciação entre a estrutura sadia e desmineralizada é possível com os comprimentos de onda na região do azul-violeta, pois a fluorescência é menor nas áreas em que há perda de mineral, fazendo com que elas sejam observadas como manchas escuras na imagem (MUJAT et al., 2004).

A origem exata da fluorescência resultante da excitação por comprimentos de onda na região do azul-violeta não é completamente conhecida, porém hoje se sabe, que ao contrário do que foi inicialmente teorizado, ela se origina predominantemente da dentina e da junção amelo-dentinária .

O que permite que o esmalte sadio e o cariado sejam diferenciados é a alteração das propriedades ópticas do tecido cariado. A ocorrência de cáries resulta em aumento da quantidade de água na estrutura, e também no aumento do coeficiente de espalhamento da luz na região da lesão em relação ao tecido sadio (PRETTY et al., 2002). O coeficiente de espalhamento aumentado causa a diminuição da fluorescência predominantemente devido ao bloqueio da fluorescência originária da dentina e da junção amelo-dentinária (TRANAEUS et al., 2002). Porém, a possibilidade de que parte desse efeito ocorra devido a uma diminuição da quantidade de luz que consegue atingir a região fluorescente e ser absorvida também tem sido mencionada (TRANAEUS et al., 2001).

No equipamento de QLF, atualmente disponível para uso clínico, a luz emitida por uma lâmpada de xenônio, que atravessa um filtro passa bandas, na região do azul-violeta ($\lambda = 404 \pm 11$ nm), é utilizada para iluminação do dente e excitação da

fluorescência. A fluorescência verde emitida pela estrutura é então capturada através de uma microcâmara CCD (“*charge coupled device*”), contendo um filtro de passa alta, que transmite apenas os comprimentos de onda maiores do que 520 nm. A partir da imagem obtida, a intensidade da fluorescência nas regiões sadias e cariadas são analisadas através do programa Inspektor Pro™, que realiza uma interpolação dos valores registrados nas áreas sadias adjacentes à lesão para calcular a porcentagem de perda de fluorescência (ΔF). Além disso, a área em mm^2 , da região com fluorescência reduzida também é registrada e integrada ao valor de variação de fluorescência (ΔF), resultando em um valor de porcentagem de perda mineral por mm^2 (ΔQ).

Todos os cálculos são feitos de maneira objetiva pelo programa e apenas um dos fatores envolvidos na análise, a determinação da área a ser analisada, depende do julgamento do examinador. Como a inclusão desse fator subjetivo representa uma fragilidade do método, a sua influência nos resultados de perda de fluorescência tem sido investigada em diversos estudos. *In vitro*, os resultados de um estudo multicêntrico com dez examinadores diferentes demonstraram um alto grau de concordância das medidas de ΔQ intra- e inter-examinador (ANDO et al., 1997) . Porém, *in vivo*, a repetibilidade e reprodutibilidade do método apresentaram uma variação maior, sendo que alguns estudos têm demonstrado um grau excelente e outros apenas moderados de concordância entre as medidas feitas por diferentes examinadores ou entres as diversas medidas de uma mesma lesão.

A capacidade do método de detectar a doença quando o tecido está realmente afetado, ou seja, a sensibilidade da técnica é por outro lado alta, e favorece o diagnóstico precoce das lesões (ANDO et al., 1997).

Além da reprodutibilidade, repetibilidade e sensibilidade do método, também a habilidade de quantificar a perda das lesões quando comparada ao padrão-ouro precisa ser observada. Nesse sentido, os resultados são bastante positivos, pois diversos estudos *in vitro* têm demonstrado que a quantidade de perda de radiança da fluorescência medida em ΔQ apresenta um alto grau de correlação com a perda e volume mineral medida através de microrradiografia transversal (ALJEHANI et al., 2004), longitudinal (PRETTY; EDGAR; HIGHAM, 2002; PRETTY et al., 2002) e também com a profundidade de lesão (ANDO et al., 2004). Da mesma forma, a correlação entre as medidas de ΔF com a perda de volume mineral e a profundidade de lesão também tem sido demonstrada (PRETTY; EDGAR; HIGHAM, 2004).

Na condução de estudos *in vitro* alguns cuidados precisam ser observados, para garantir uma maior acurácia dos resultados. As medidas de lesões de cárie incipientes feitas *in vitro*, são influenciadas por diversos fatores relacionados ao ambiente em que o experimento é realizado e também à lesão de cárie em si. Fatores como a iluminação da sala, o ângulo existente entre a câmera e a superfície do dente e também o grau de desidratação da lesão precisam ser padronizados para que o grau de confiabilidade dos dados seja o maior possível. A iluminação do ambiente, por exemplo, apresenta uma influência direta nas medidas de QLF. A avaliação de medidas feitas em diferentes intensidades de luz, mostra que uma intensidade de luz ambiente maior que 88 lux causa uma queda estatisticamente significativa das medidas de ΔQ , comprometendo a confiabilidade dos dados (ANDO et al., 2003). Também a captura das imagens em ângulos, 20° graus maiores ou menores do que 90° entre a superfície da lesão de cárie incipiente e a câmera, resulta em valores de ΔQ significativamente menores que os valores máximos obtidos na relação perpendicular (PRETTY; EDGAR; HIGHAM, 2002; PRETTY et al.,

2003; PRETTY;EDGAR;HIGHAM, 2004). Outro fator que pode alterar a confiabilidade dos dados é o grau de desidratação das lesões. A comparação entre a secagem com roletes de algodão, a secagem natural na bancada e a secagem através da utilização de um jato de ar comprimido por 15 s mostraram que esta última resulta no maior grau de confiabilidade das medidas de ΔQ . Sendo que o mesmo resultado foi observado tanto para amostras armazenadas em água destilada como em saliva humana total (PRETTY; ELLWOOD, 2007).

A espessura do esmalte também apresenta uma influência importante nas medidas de QLF e tanto os estudos através de simulação de Monte Carlo quanto os experimentais (*in vitro*) mostram que quanto maior a espessura do esmalte, menor é a fluorescência, resultando assim em um menor contraste entre lesão e esmalte sadio (ANDO et al., 2003).

A técnica de QLF pode ser utilizada de forma efetiva não somente para o estudo de lesões incipientes de dentes permanentes, mas também para o monitoramento de lesões em dentes decíduos e de outros tipos de lesões, como as lesões de erosão e as cáries secundárias ao redor de restaurações de amálgama, cimentos temporários e compósitos (PRETTY et al., 2003; PRETTY; EDGAR;HIGHAM, 2004) . Porém o método apresenta limitações para a detecção de lesões oclusais e interproximais *in vivo*.

No que se refere aos estudos *in situ*, um modelo de estudo também já foi testado e provou a habilidade do método de QLF para o monitoramento tanto da desmineralização provocada por alimentos cariogênicos como também a remineralização obtida através do uso de cremes dentais e enxaguatórios bucais

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar *in vitro* o efeito do laser de CO₂, associado ou não à aplicação tópica de flúor, na redução da desmineralização de superfícies radiculares humanas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Foram utilizados no presente estudo os seguintes materiais e equipamentos:

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

- Equipo odontológico Kavo: seringa tríplice.
- Laser de CO₂ e óculos de proteção (UM-L30, Union Medical Engineering Co., Yangju-si, Gyeongji-Do, Korea – PROJETO FAPESP CEPID/CEPOF, Processo n. 98/14270-8).

Equipamentos pertencentes ao Departamento de Dentística da FOUSP:

- Micromotor e peça de mão (NSK, Japão)
- Disco de corte diamantado de dupla face para peça de mão (NOSS@LIG produtos odontológicos LTDA, Brasil)
- Lupa estereoscópica (Carl Zeiss 475200/9001- Jena, Alemanha)

- QLF TM System (Inkspector Research Systems BV, Amsterdam, NL – Auxílio Pesquisa Regular FAPESP, processo 2006/01177-8)

Materiais utilizados:

- Água destilada e deionizada
- Cola à base de silicone
- Escovas tipo Robinson (KG Sorensen, Brasil)
- Esmalte cosmético (Risqué, Niasi, São Paulo, Brasil)
- Fios ortodônticos de liga de Ti-Co (Morelli, Sorocaba-SP, Brasil)
- Vinte e cinco (25) terceiros molares humanos hígidos
- Papel absorvente
- Pasta de alumina de 5 μm (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA)
- Pinça metálica
- Pistola para cola quente
- Recipientes de poliestireno – 50 mL (Falcon)
- Solução remineralizadora e desmineralizadora
- Solução de timol a 0,1% e 0,01%
- Vidrarias (béquer, pipetas, balão volumétrico)
- Lápis preto 2B (Faber Castell, Brasil)

4.2 Métodos

4.2.1 Delineamento experimental

O fator em estudo foi a análise da perda mineral da superfície radicular através do QLF, utilizando 5 níveis de tratamentos de superfície, um controle negativo (sem tratamento), um controle positivo (uso de flúor fosfato acidulado), e 3 tratamentos experimentais. As unidades experimentais foram compostas de 50 de espécimes de fragmentos radiculares, obtidos de 25 terceiros molares hígidos (n=10). A variável resposta foi a perda mineral (ΔQ), calculada através do QLF.

4.2.2 Aspectos éticos

O presente estudo foi conduzido após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, conforme Protocolo 148/06 (Anexo A e Anexo B)

4.2.3 Preparo dos espécimes

Os dentes foram armazenados em solução de timol 0,1% pelo período mínimo de 30 dias. Após esse período, foram submetidos a limpeza com curetas periodontais, seguida de banho de ultra-som durante 30 s, e posteriormente a uma profilaxia com escova Robinson e pasta de alumina (5 μ m) em baixa rotação durante 30 s e a novo banho de ultra-som de 30 s . Posteriormente, os dentes foram examinados sob lupa estereoscópica com aumento de 10X, descartando-se aqueles com trincas ou anomalias de estrutura e mantidos em meio úmido a 4°C até a sua utilização.

Para obtenção dos espécimes, os dentes foram seccionados para remoção da porção coronária, a 1 mm da junção amelo-cementária, a qual foi descartada. Novas secções foram feitas na porção radicular, de modo a obter dois espécimes de 4 mm X 4 mm x 2 mm de cada dente. Os 50 espécimes foram divididos aleatoriamente em 5 grupos como descrito na figura 4.1.

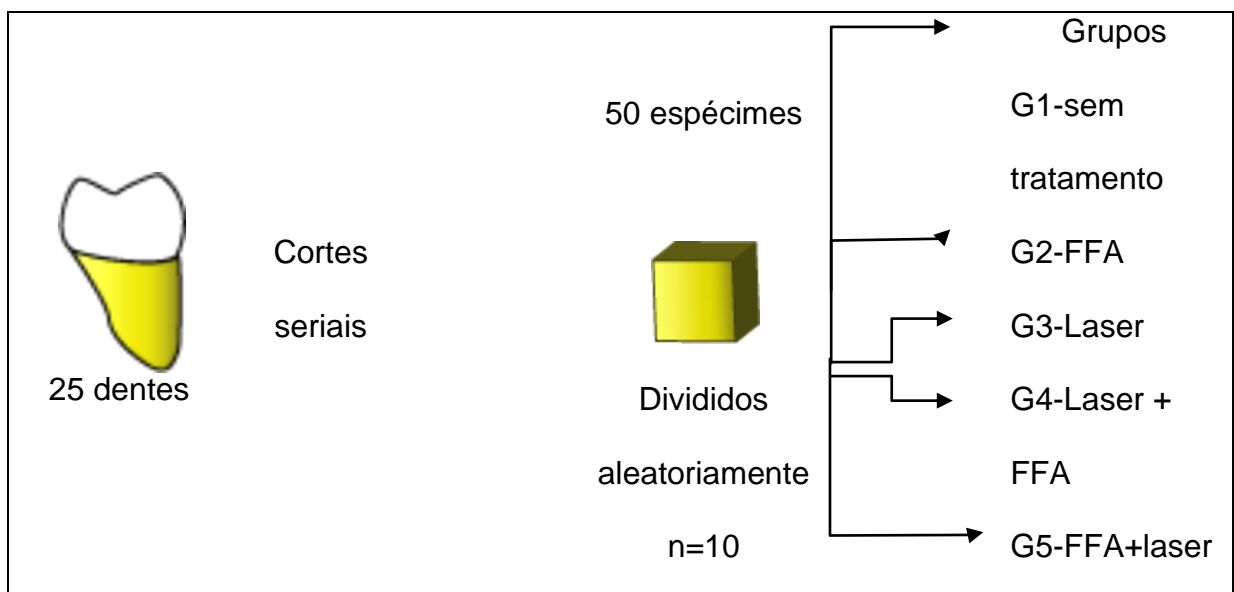


Figura 4.1- representativa do delineamento experimental do presente estudo

4.2.4 Tratamento da superfície de dentina radicular com laser pulsado de CO₂

A irradiação das superfícies de dentina radicular foi realizada no Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO), da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo usando um laser de CO₂ pulsado (figura 4.2), com comprimento de onda de 10,6 µm. Segundo as especificações do aparelho, o modo de emissão pode ser contínuo com potência média de até 10 W, ou pulsado com potência de até 6 W, enquanto a duração de pulso pode variar de 50 a 500 ms. A seleção dos parâmetros da irradiação foi baseada em estudo de Souza-Zaroni (2007). A irradiação dos espécimes foi realizada com a taxa de repetição fixa de 50 Hz, duração do pulso de 10 ms, 10 ms de time off, diâmetro do feixe de 0,3 mm e a potência utilizadas para os grupos G3, G4 e G5 foi de, 0,7 W. A densidade de energia, nesta condição foi de aproximadamente 4,0 J/cm². A irradiação foi realizada com a ponta ativa do laser perpendicular à superfície dental a uma distância de 5 mm da mesma por um período de 10 segundos, percorrendo-se toda a superfície de dentinaradicular previamente delimitada (área de 2 x 2 mm) com auxílio de lápis preto.



Figura 4.2 – Equipamento de laser de CO₂ e a ponta utilizada para procedimento de irradiação dos espécimes

4.2.5 Ciclagem de pH

Após a irradiação dos espécimes, foi realizada a delimitação da área de dentina que seria exposta às soluções desmineralizadora e remineralizadora durante a ciclagem de pH. Cada espécime foi recoberto com verniz ácido resistente transparente na face irradiada, deixando uma área de dentina exposta (janela) medindo 2 x 2 mm. Nas outras faces, foi utilizado esmalte ácido resistente na cor vermelha.

A ciclagem de pH foi feita segundo o modelo proposto por Kawasaki e Featherstone (1997) modificado por Souza-Zaroni (2007).

Cada espécime foi fixado, com cola à base de silicone aquecida com auxílio de uma pistola específica (“pistola para cola quente”), à ponta de um fio ortodôntico de liga de Ti-Co. O fio ortodôntico de Ti-Co foi preso à tampa do recipiente de poliestireno (Falcon) de 50mL. Onde o mesmo, apresentava-se fixada juntamente com outras 9 tampas, também com auxílio de cola à base de silicone, à um suporte de madeira, de modo que os 10 espécimes de cada grupo estudado ficassem suspensos e imersos totalmente nas soluções desmineralizadora e remineralizadora durante a ciclagem de pH (figura 4.3).

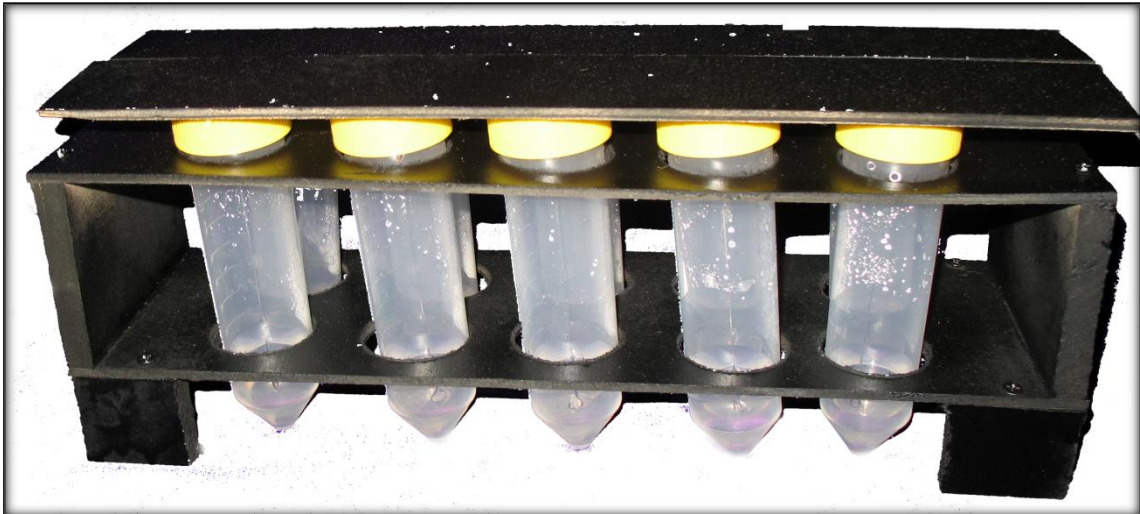


Figura 4.3 Dispositivo de suporte para ciclagem de pH

A ciclagem de pH foi realizada durante 5 dias, nos quais os espécimes de dentina foram imersos por 3 h em solução desmineralizadora e por aproximadamente 21 h em solução remineralizadora (SOUZA-ZARONI, 2007). Durante este período, os espécimes foram lavados com água deionizada antes e após imersão na solução desmineralizadora (duas vezes ao dia) por 10 segundos e secos com papel absorvente. Após o quinto dia, os espécimes permaneceram em solução remineralizadora por dois dias (correspondente aos dias do final de semana).

Os espécimes foram mantidos individualmente em solução desmineralizadora contendo 2,0 mmol/L Ca, 2,0 mmol/L P em 75 mmol/L de tampão acetato, pH 4,8. A solução remineralizadora utilizada continha 1,5 mmol/L Ca, 0,9 mmol/L P, 150 mmol/L KCl em 20 mmol/L tampão Tris, pH 7,0. A composição química desta solução aproxima-se do grau de saturação dos minerais da apatita encontrados na saliva (TEN CATE; DUIJSTERS, 1982). Cristais de timol foram adicionados as soluções para evitar o crescimento bacteriano e fúngico.

Foram utilizados 6,25 ml/mm² e 3,12 ml/mm² das soluções desmineralizadora e remineralizadora respectivamente, por área de tratamento. Durante todo o processo, os espécimes permaneceram em estufa ajustada a 37°C, exceto nos intervalos de lavagem e alternância das soluções. Terminada a ciclagem de pH, os espécimes foram lavados com jatos de água destilada e deionizada durante 10 s, secos com papel absorvente e mantidos em ambiente fechado, úmido e sob refrigeração até a leitura da perda mineral através do método do QLF.

4.2.6 Leitura QLF

Os espécimes tiveram o esmalte transparente retirado através de uma lamina de bisturi nº11, e com o auxílio de uma borracha branca, o perímetro feito anteriormente foi apagado. Cada espécime foi seco com jato de ar durante 15s, para padronizar sua secagem, e em seguida foi colocado em suporte do aparelho QLF in

vitro (figura 4.4), e em câmara escura, foi feita sua leitura através do método de mensuração de mancha branca (White spot). O aparelho utiliza a área ao redor da janela de ciclagem (área hígida) para calcular a perda mineral da área ciclada. Através do cálculo da fluorescência da área hígida e área ciclada (ΔF), foi calculado a variação mineral existente entre as áreas (ΔQ).

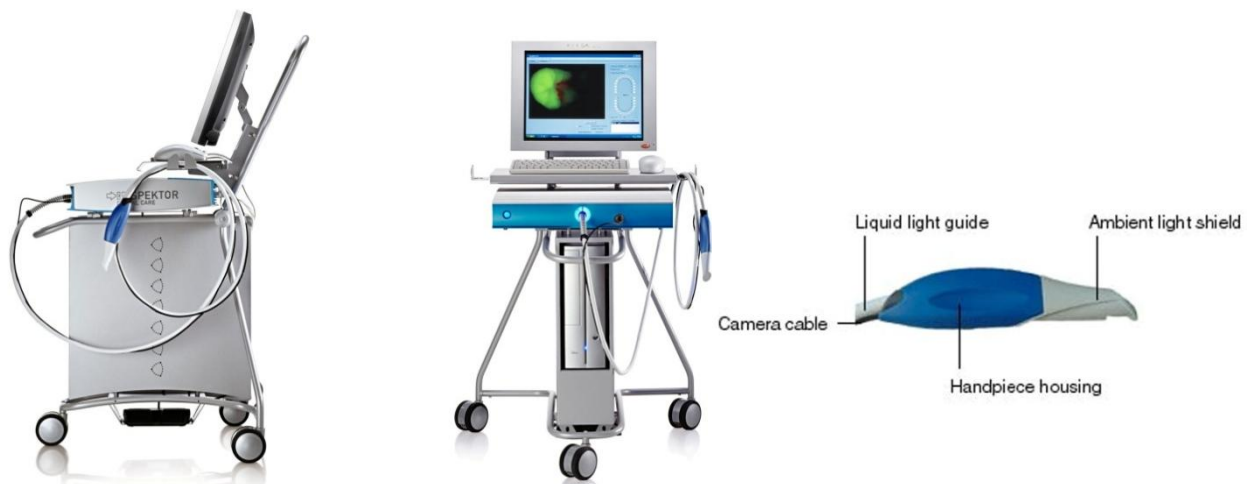


Figura 4.4 – Aparelho QLF e peça de mão para análise

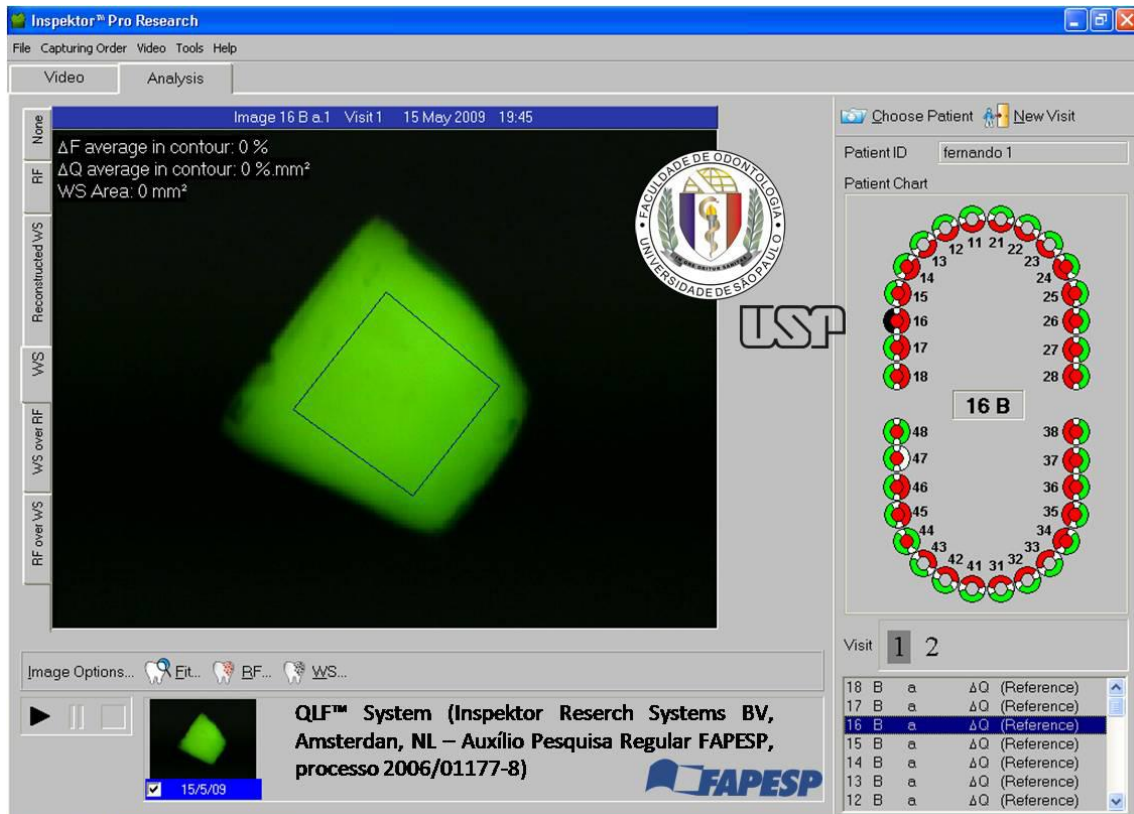


Figura 4.5 – Avaliação da perda mineral-perda de 0%

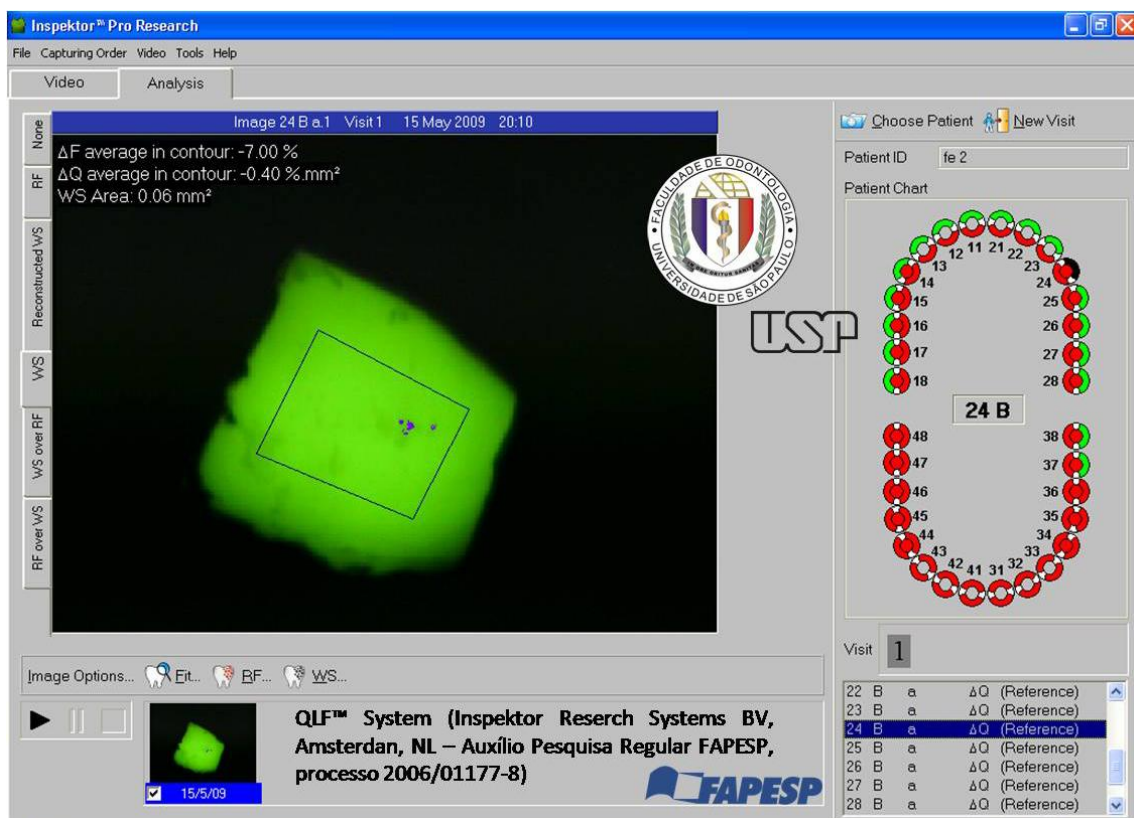


Figura 4.6 – Avaliação da perda mineral-variação de -0,40%/mm²

4.2.7 Análise estatística

Para análise dos dados, foi utilizado o Programas SPSS 14.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). A variável resposta analisada foi a perda mineral do substrato, representada pelo parâmetro ΔQ , os diferentes tratamentos representam a fonte de variação. Foi feita os testes preliminares de normalidade Kologorov – Smirnov, e o teste de homogeneidade de Levene . A análise estatística consistiu da Análise de Variância, comprovada através do teste de Brown Forsythe. Para análise complementar de múltipla comparação, utilizou-se o teste de Games & Howell.

5 RESULTADOS

Este trabalho possui um único fator de variação, o tratamento da superfície radicular humana, dividido em cinco níveis: G1 – Controle Negativo; G2 – Controle Positivo; G3 – Laser; G4 Laser + FFA e G5 – FFA + Laser.

Tal fator de variação será analisado através de uma variável de resposta, que é a perda mineral observada através da técnica QLF, representada pelo valor de Delta Q (Delta Q = Porcentagem por milímetro quadrado).

5.1 Estatística Descritiva

Tabela 5.1 - Estatística descritiva

Grupos	N	Média	Desvio	Erro-padrão	Lim. Inf.	Lim. Sup.	Mínimo	Máximo	Cv
G1	10	-0.373	0.209	0.066	-0.523	-0.224	-0.70	-0.1	0.560
G2	10	-0.043	0.086	0.027	-0.104	0.018	-0.21	0.0	0.503
G3	10	-0.03	0.059	0.019	-0.072	0.012	-0.19	0.0	0.508
G4	10	-0.077	0.164	0.052	-0.194	0.04	-0.53	0.0	0.471
G5	10	-0.068	0.128	0.04	-0.16	0.024	-0.40	0.0	0.531
Total	50	-0.118	0.186	0.026	-0.171	-0.065	-0.70	0.0	0.539

A tabela acima mostra a estatística descritiva dos dados desse trabalho experimental.

5.2 Modelo experimental

O modelo estatístico escolhido para a análise dos dados deste estudo experimental foi o teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA) de um fator.

5.3 Teste de Normalidade

Tabela.5.2 Teste de normalidade para a variável dependente

Statistic	Gl	<i>valor-p.</i>
0.283	50	$p < 0.05$

O teste de normalidade Kolmogorov – Smirnov foi significativo, com valor de $p < 0,05$; indicando que os dados não apresentam distribuição normal. Apesar dos dados não estarem distribuídos de maneira normal, o teste F da ANOVA é conhecidamente robusto à falta de normalidade (DAY; QUINN, 1989).

5.4 Teste de homogeneidade.

Tabela 5.3 Tabela do teste de homogeneidade

Levene Statistic (F)	gl1	gl2	valor-p
2.821	4	45	0.036

O teste de homogeneidade de Levene apontou que $F(4,45)=2,821$; $p=0,036$; significativo, sendo então os dados não homogêneos. Neste caso, o resultado do teste F da ANOVA foi confirmado pelo teste robusto de homogeneidade de Brown e Forsythe (BROWN; FORSYTHE, 1974).

5.5 ANOVA

Tabela 5.4 Tabela da Análise de Variância

Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F calc.	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.827446	4	0.206861	10.58861	0.000	2.578739
Dentro dos grupos	0.87913	45	0.019536			
Total	1.706576	49				

O resultado do teste de ANOVA aponta que o fator Tratamento de Superfície, $F(4;45)=10,58$; é significativo com valor de $p<0,05$.

Como o teste de homogeneidade foi significativo, a ANOVA foi confirmada pelo teste de Brown e Forsythe (BF).

Tabela 5.5 Tabela com confirmação da ANOVA- teste de Brown-Forsythe

DELTA Q	Statistic ^a	gl1	gl2	valor-p
Brown-Forsythe	10.589	4	28.983	0.000

a. Asymptotically F distributed.

O teste BF $F(4,16) = 10.59$, $p < 0,01$, confirma a consistência do resultado do teste F da ANOVA.

A fim de se detectar diferenças entre o grupo controle e os outros grupos (controle positivo e experimentais), o teste complementar de múltipla comparação, Games & Howell foi aplicado. Este teste paramétrico é indicado para os casos de desvios da condição de normalidade e homogeneidade (DAY; QUINN, 1989). O teste de Games & Howell é realizado para cada par de médias (“pairwise”), ajustando o erro para cada comparação.

5.6 Teste de Múltipla Comparação

Tabela 5.6 - Teste de Múltipla comparação de Games & Howell para os grupos experimentais

Grupos	Médias	Desvio-Padrão	% de inibição
G1	-0.373 ^a	±0.209	
G2	-0.043 ^b	±0.086	88,47%
G3	-0.030 ^b	±0.059	91,96%
G4	-0.077 ^b	±0.164	79,36%
G5	-0.068 ^b	±0.128	81,76%

Dados dispostos em Média±Desvio-padrão.n=10

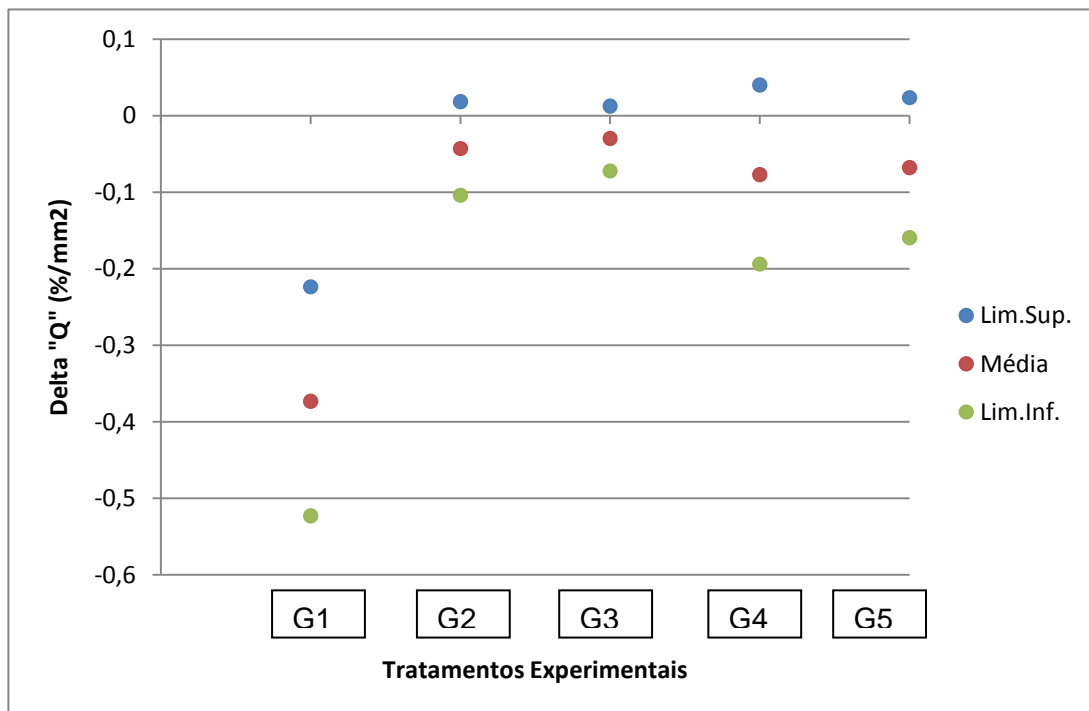


Figura 5.1 -Dispersão dos intervalos de confiança em 95%

A tabela 5.6 e o Figura.5.1 mostram o comportamento das médias do fator tratamento de superfície. Pode-se observar que o grupo Controle Negativo G1 (-0.373 ± 0.209) é diferente estatisticamente e, apresenta os menores valores de Delta Q, em relação aos grupos Controle positivo FFA, G2 (-0.043 ± 0.086), Laser G3 (-0.030 ± 0.059), Laser + FFA (-0.077 ± 0.164) e FFA+Laser (-0.068 ± 0.128). Os grupos G2, G3, G4 e G5, não apresentam diferença significativa entre si. Juntamente na tabela 5.6, pode se observar a porcentagem de inibição em relação ao grupo controle negativo.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo empregou o método de quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF) para mensuração da perda mineral relativa dos espécimes de raiz dentária humana. Tal método tem sido muito utilizado tanto em estudos *in vitro* e *in situ*, quanto em estudos *in vivo* para detecção e quantificação de lesões de cárie (SPITZER; TEN BOSCH, 1977; ALFANO; YAO, 1981; MUJAT et al., 2003).

Entre os diversos métodos ópticos recentemente estudados, o método QLF apresenta um alto grau de correlação com a perda de volume mineral observada em microradiografia. (ALJEHANI et al., 2004), Contudo a quantificação da perda mineral através desta técnica é realizada de maneira não destrutiva e permite o monitoramento de lesões quanto à perda e ganho mineral ao longo do tempo, o que é essencial para que se consiga determinar o grau de atividade de lesão e, conseqüentemente, um correto plano de tratamento para a doença cárie (ALFANO; YAO, 1981).

Adicionalmente, quando considerado o ponto de vista do uso em estudos *in vitro*, o método QLF também apresenta vantagens quando comparado a outros métodos muito empregados neste tipo de estudo, como a própria microradiografia, a análise de microdureza em secção transversal ou ainda a mensuração da profundidade de lesão através de luz polarizada, pois se trata de um método rápido e que permite a mensuração de perda mineral na mesma amostra várias vezes no decorrer do tempo e da aplicação da terapia que se quer avaliar.

Tal capacidade de quantificação da perda mineral nos tecidos duros dentais foi claramente observada no presente estudo, visto que a técnica QLF permitiu a verificação de perda mineral nos espécimes de superfície radicular do grupo controle negativo (sem qualquer tipo de tratamento) em relação ao grupo controle positivo (tratado com FFA) e aos grupos experimentais com laser de CO₂. Entretanto, a observação de diferenças significativas entre os grupos experimentais e o grupo controle positivo não foi detectada por este método.

De forma semelhante, (ESTEVEES-OLIVEIRA, 2007) empregou a técnica QLF para verificação do efeito da irradiação com laser de CO₂ sobre as medidas de fluorescência do esmalte dental submetido a um modelo químico de produção de cárie, e observou que tal técnica não apresentou resultados tão sensíveis quanto os apresentados pela mensuração das profundidades das lesões cariosas através de luz polarizada, mostrando baixa correlação com as medidas deste último método. No entanto, foi capaz de identificar as principais diferenças de desmineralização entre os grupos testados.

Apesar da semelhança entre o presente estudo e o de Esteves-Oliveira (2007), a comparação direta da eficácia do método QLF para mensuração de lesões em esmalte e dentina é complicada, uma vez que se observa na literatura o relato de estudos que demonstram uma melhor eficácia do método em quantificar lesões dentinárias (ANDO et al., 2003). Tal fato pode ser explicado pela influência da espessura do esmalte nos espécimes submetidos à mensuração de fluorescência, uma vez que a fluorescência medida por esta técnica é originária da dentina e da junção amelo-dentinária (TRANAEUS et al., 2002). Desta forma, quanto maior a espessura do esmalte, menor é a fluorescência, resultando assim em um menor contraste entre lesão e esmalte sadio (ANDO et al., 2003).

Neste contexto, visto que as medidas de perda mineral entre os grupos experimentais testados não foram diferentes entre si, como também não diferiram do grupo tratado somente com flúor, apesar da alta sensibilidade relatada na literatura sobre o método QLF para lesões em dentina, pode-se supor que a ciclagem de pH a que foram submetidos os espécimes estudados não foi severa o suficiente para promover maior diferenciação entre os grupos.

O modelo de ciclagem de pH empregado neste estudo foi modificado a partir do modelo de Kawasaki e Featherstone (1997), com 7 dias de duração total, sendo que durante 5 dias os espécimes ficavam por 3h em solução desmineralizadora e por 21h em solução remineralizadora, e nos últimos dois dias, permaneciam em solução remineralizadora (SOUZA-ZARONI, 2007). De forma distinta da presente pesquisa, o trabalho de Gao, Pan e Hsu (2006), que utilizou uma ciclagem de pH com 2 dias de duração e tempo de imersão em solução desmineralizadora de 18h e em solução remineralizadora de 6h, verificou um significativo efeito sinérgico da associação de tratamento com fluoreto e irradiação com laser de CO₂, com comprimento de onda de 10,6 µm, para a inibição da desmineralização de superfícies radiculares, exibindo porcentagem de inibição em torno de 85%.

Por outro lado, o estudo de Featherstone et al. (2003), que empregou ciclagem de pH de 5 dias e 4 noites, com 18h em solução desmineralizadora e 6h em solução remineralizadora, não foi capaz de verificar diferenças significativas entre os grupos que foram irradiados com diferentes fluências do laser de CO₂, com comprimento de onda de 9,6 µm, sendo que estes grupos promoveram aumento da desmineralização da dentina ao invés de diminuí-la, e somente o grupo tratado com flúor promoveu porcentagem de inibição em torno de 33%.

Contrariando o estudo de Featherstone et al. (2003), a presente pesquisa demonstrou a capacidade do laser de CO₂ (λ 10,6 μ m) de reduzir a perda mineral em espécimes de raízes dentárias, compostas principalmente por dentina.

Estudos que utilizaram o laser de CO₂ com comprimento de onda 10,6 μ m com densidades de energia de 0,3 a 12,5 J/cm², têm demonstrado a redução significativa da perda mineral em esmalte dental (FEATHERSTONE et al., 1998; KANTOROWITZ; FEATHERSTONE; FRIED, 1998; KLEIN et al., 2005; TANGE; FRIED; FEATHERSTONE, 2000; STEINER-OLIVEIRA et al., 2006). Estes resultados, juntamente com a possibilidade de utilizar essa tecnologia disponível no mercado na prevenção da cárie, têm estimulado o desenvolvimento de novas pesquisas com o $\lambda=10,6$ μ m.

No entanto, quando se refere à dentina e/ou ao cimento, tecidos que compõem a superfície radicular, poucos estudos foram realizados com o objetivo de demonstrar o efeito do laser de CO₂ na redução da desmineralização desses substratos. A dentina possui um conteúdo mineral em torno de 47%, 33% de proteínas e lipídios, e 20% de água (FEATHERSTONE, 1994). Tal composição diminui a contribuição da fase mineral e enfatiza o papel da água e da proteína na absorção de luz por este tecido (WIGDOR et al., 1995), e também determina as diferentes propriedades térmicas deste tecido. A menor capacidade de transmissão de calor pela dentina significa que a energia térmica irá se acumular neste tecido por um período maior de tempo do que no esmalte. Esse fato pode ter consequências negativas sobre a interação da luz laser com o tecido, tais como a vaporização subsuperficial, o aparecimento de fendas e a necrose pulpar. A dentina encontra-se em uma posição mais próxima à polpa do que o esmalte, e dessa forma, o calor aplicado à sua superfície é transmitido mais rapidamente ao tecido pulpar.

Na presente pesquisa, foram empregados parâmetros (4 J/cm²) já testados anteriormente (SOUZA-ZARONI, 2007), os quais demonstraram, através de uma análise termográfica, promover uma pequena variação de temperatura no interior da câmara pulpar (em torno de 0,6°C) durante a irradiação da superfície radicular.

Desta forma, verifica-se que, para prevenir a cárie dental, a luz laser deve alterar a composição ou a solubilidade do substrato dental, e a energia deve ser fortemente absorvida e eficientemente convertida em calor sem causar danos aos tecidos subjacentes ou que estão ao redor do tecido irradiado. Tais condições foram provavelmente alcançadas no presente estudo, uma vez que a irradiação com o laser de CO₂ foi capaz de promover uma redução significativa da desmineralização da superfície radicular quando comparada àquela do grupo controle negativo, que não foi submetido a qualquer tratamento preventivo. Desta forma, a porcentagem de redução de desmineralização observada neste estudo variou de 79,36% a 91,96% para os grupos irradiados com laser de CO₂ seguido de aplicação tópica de FFA e somente irradiado com laser de CO₂, respectivamente.

Já para o grupo tratado apenas com a aplicação de FFA a 1,23%, a porcentagem de inibição foi de 88,47%; número ainda superior ao encontrado na literatura para a dentina humana, que fica em torno de 50-60% (FEATHERSTONE, 1994). Entretanto, quando se compara o efeito do fluoreto com o efeito do laser observa-se que o efeito do fluoreto é limitado com o tempo, enquanto que a duração do efeito do laser permanece desconhecida. Assim, a determinação da combinação ideal de vários tratamentos preventivos de cárie seria especialmente útil considerando o fato que lesões de cárie primária em superfície radicular, como também lesões secundárias ao redor de restaurações realizadas nestas superfícies,

tendem a se tornar cada vez mais frequentes com o envelhecimento da população mundial.

Por fim, torna-se necessária a utilização de outros modelos in vitro, e principalmente, modelos in situ e in vivo, que forneçam dados complementares para uma avaliação mais ampla do comportamento da superfície radicular, quando irradiada com laser de CO₂, frente a desafios cariogênicos característicos destas condições.

7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações de um estudo in vitro, pode-se concluir que o laser de CO₂, associado ou não à aplicação tópica de flúor, é capaz de inibir a desmineralização da superfície radicular, contudo não se observa efeito sinérgico com a associação da irradiação com laser e tratamento com flúor.

REFERÊNCIAS¹

Alfano RR, Yao SS. Human teeth with and without dental caries studied by visible luminescent spectroscopy. *J Dent Res* 1981; 60 (2):120-2.

Aljehani A, Tranaeus S, Forsberg CM, Angmar-Mansson B, Shi XQ. In vitro quantification of white spot enamel lesions adjacent to fixed orthodontic appliances using quantitative light-induced fluorescence and DIAGNOdent. *Acta Odontol Scand* 2004; 62 (6):313-8.

Ando M, Eckert GJ, Stookey GK, Zero DT. Effect of imaging geometry on evaluating natural white-spot lesions using quantitative light-induced fluorescence. *Caries Res* 2004; 38 (1):39-44.

Ando M, Hall AF, Eckert GJ, Schemehorn BR, Analoui M, Stookey GK. Relative ability of laser fluorescence techniques to quantitate early mineral loss in vitro. *Caries Res* 1997; 31 (2):125-31.

Ando M, Schemehorn BR, Eckert GJ, Zero DT, Stookey GK. Influence of enamel thickness on quantification of mineral loss in enamel using laser-induced fluorescence. *Caries Res* 2003; 37 (1):24-8.

Angmar B, Carlstrom D, Glas JE. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. *J Ultrastruct Res* 1963; 8:12-23.

Arends J, Schuthof J, Jongebloed WG. Lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions. *Caries Res* 1980; 14 (4):190-5.

Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res* 1992; 71 Spec No:924-8.

Benedict HC. A Note on the Fluorescence of Teeth in Ultra-Violet Rays. *Science* 1928; 67 (1739):442.

Borggreven JM, van Dijk JW, Driessens FC. Effect of laser irradiation on the permeability of bovine dental enamel. *Arch Oral Biol* 1980; 25 (11-12):831-2.

Brown MB, Forsythe AB. Robust Tests for Equality of Variances. *J. Amer. Statistical Assoc.* 1974; 69 (346):364-367.

Buchalla W. Comparative fluorescence spectroscopy shows differences in noncavitated enamel lesions. *Caries Res* 2005; 39 (2):150-6.

Day RW, Quinn GP. Comparisons of Treatments after an Analysis of Variance in Ecology. *Ecological Monographs* 1989; 59 (4):433-463.

Eliasson S, Krasse B, Soremark 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. Avaliação de diferentes parâmetros para irradiação do esmalte dental com o laser de CO₂ visando a redução da desmineralização. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007

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

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

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; 77 (6):1397-403.

Featherstone JD, Fried D, Le CQ. Effect of a New Carbon Dioxide Laser Treatment on Artificial Caries Progression in Dentin. *Proceedings of SPIE* 2003; 4950:236-40.

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

Ferreira JM, Palamara J, Phakey PP, Rachinger WA, Orams HJ. Effects of continuous-wave CO₂ laser on the ultrastructure of human dental enamel. *Arch Oral Biol* 1989; 34 (7):551-62.

Fowler BO, Kuroda S.Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. *Calcif Tissue Int* 1986; 38 (4):197-208.

Furseth R.Further observations on the fine structure of orally exposed and carious human dental cementum. *Arch Oral Biol* 1971; 16 (1):71-85.

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

Griffin SO, Griffin PM, Swann JL, Zlobin N.Estimating rates of new root caries in older adults. *J Dent Res* 2004; 83 (8):634-8.

Habelitz S, Fried D, Le CQ, Featherstone JD.Nanomechanical Properties of Dentin Treated with a CO2 Laser for Potential Caries Inhibition. *Proc. of SPIE* 2008; 6843, 684306.

Hals E, Selvig KA.Correlated electron probe microanalysis and microradiography of carious and normal dental cementum. *Caries Res* 1977; 11 (1):62-75.

Hara AT, Queiroz CS, Freitas PM, Giannini M, Serra MC, Cury JA.Fluoride release and secondary caries inhibition by adhesive systems on root dentine. *Eur J Oral Sci* 2005; 113 (3):245-50.

Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA.Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res* 2003; 37 (5):339-44.

Hawkins RJ.Functional status and untreated dental caries among nursing home residents aged 65 and over. *Spec Care Dentist* 1999; 19 (4):158-63.

Hicks MJ, Silverstone LM.Acid-etching of caries-like lesions of enamel: a polarized light microscopic study. *Caries Res* 1984; 18 (4):315-26.

Holmen L, Thylstrup A, Ogaard B, Kragh F.A polarized light microscopic study of progressive stages of enamel caries in vivo. *Caries Res* 1985; 19 (4):348-54.

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

IBGE. Esperanças de Vida ao Nascer - 1990-2008. Disponível em:
http://www.ibge.gov.br/brasil_em_sintese/ [Data de acesso 2009/ 04 /21]

IBGE. Projeção da População do Brasil por sexo e idade: 1980-2050 - Revisão 2008. Disponível em:
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/
[Data de acesso 2009/ 04/21]

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.

Kawasaki K, Featherstone JD. Effects of collagenase on root demineralization. *J Dent Res* 1997; 76 (1):588-95.

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

Konig K, Schneckenburger H, Hibst R. Time-gated in vivo autofluorescence imaging of dental caries. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1999; 45 (2):233-9.

LeGeros RZ. Chemical and crystallographic events in the caries process. *J Dent Res* 1990; 69 Spec No:567-74; discussion 634-6.

McCormack SM, Fried D, Featherstone JD, Glana RE, Seka W. Scanning electron microscope observations of CO₂ laser effects on dental enamel. *J Dent Res* 1995; 74 (10):1702-8.

Mendes FM, Nicolau J, Duarte DA. Evaluation of the effectiveness of laser fluorescence in monitoring in vitro remineralization of incipient caries lesions in primary teeth. *Caries Res* 2003; 37 (6):442-4.

Mujat C, van der Veen MH, Ruben JL, Dogariu A, ten Bosch JJ. The influence of drying on quantitative laser fluorescence and optical pathlengths in incipient natural caries lesions. *Caries Res* 2004; 38 (5):484-92.

Mujat C, van der Veen MH, Ruben JL, ten Bosch JJ, Dogariu A. Optical path-length spectroscopy of incipient caries lesions in relation to quantitative light-induced fluorescence and lesion characteristics. *Appl Opt* 2003; 42 (16):2979-86.

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.

Nelson DG, Shariati M, Glana R, Shields CP, Featherstone JD. Effect of pulsed low energy infrared laser irradiation on artificial caries-like lesion formation. *Caries Res* 1986; 20 (4):289-99.

Nelson DG, Wefel JS, Jongebloed WL, Featherstone JD. Morphology, histology and crystallography of human dental enamel treated with pulsed low-energy infrared laser radiation. *Caries Res* 1987; 21 (5):411-26.

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.

Pogrel MA, Muff DF, Marshall GW. Structural changes in dental enamel induced by high energy continuous wave carbon dioxide laser. *Lasers Surg Med* 1993; 13 (1):89-96.

Pretty IA, Edgar WM, Higham SM. The effect of ambient light on QLF analyses. *J Oral Rehabil* 2002; 29 (4):369-73.

Pretty IA, Ellwood RP. Comparison of paired visual assessment and software analyses of changes in caries status over 6 months from fluorescence images. *Caries Res* 2007; 41 (2):115-20.

Pretty IA, Smith PW, Edgar WM, Higham SM. The use of quantitative light-induced fluorescence (QLF) to identify composite restorations in forensic examinations. *J Forensic Sci* 2002; 47 (4):831-6.

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.

Sato K. Relation between acid dissolution and histological alteration of heated tooth enamel. *Caries Res* 1983; 17 (6):490-5.

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

Seichter U. Root surface caries: a critical literature review. *J Am Dent Assoc* 1987; 115 (2):305-10.

Shen S, Samaranayake LP, Yip HK. In vitro growth, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. *J Dent* 2004; 32 (8):667-78.

Silverstone LM. Structure of carious enamel, including the early lesion. *Oral Sci Rev* 1973; 3:100-60.

Silverstone LM, Hicks MJ, Featherstone MJ. Dynamic factors affecting lesion initiation and progression in human dental enamel. Part I. The dynamic nature of enamel caries. *Quintessence Int* 1988; 19 (10):683-711.

Souza-Zaroni WCd. Determinação de parâmetros seguros e efetivos do laser de CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$) na redução da desmineralização da dentina radicular – Estudo in vitro. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007

Spitzer D, ten Bosch JJ. Luminescence quantum yields of sound and carious dental enamel. *Calcif Tissue Res* 1977; 24 (3):249-51.

Stern RH, Vahl J, Sognaes RF. Lased enamel: ultrastructural observations of pulsed carbon dioxide laser effects. *J Dent Res* 1972; 51 (2):455-60.

ten Cate JM, Duijsters PP. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 1982; 16 (3):201-10.

Theuns HM, van Dijk JW, Jongebloed WL, Groeneveld A. The mineral content of human enamel studied by polarizing microscopy, microradiography and scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol* 1983; 28 (9):797-803.

Tranaeus S, Al-Khateeb S, Bjorkman S, Twetman S, Angmar-Mansson B. Application of quantitative light-induced fluorescence to monitor incipient lesions in caries-active children. A comparative study of remineralisation by fluoride varnish and professional cleaning. *Eur J Oral Sci* 2001; 109 (2):71-5.

Tranaeus S, Shi XQ, Lindgren LE, Trollsas K, Angmar-Mansson B. In vivo repeatability and reproducibility of the quantitative light-induced fluorescence method. *Caries Res* 2002; 36 (1):3-9.

Van Houte J, Jordan HV, Laraway R, Kent R, Soparkar PM, DePaola PF. Association of the microbial flora of dental plaque and saliva with human root-surface caries. *J Dent Res* 1990; 69 (8):1463-8.

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

Wefel JS, Harless JD. Comparison of artificial white spots by microradiography and polarized light microscopy. *J Dent Res* 1984; 63 (11):1271-5.

Wefel JS, Harless JD. Topical fluoride application and lesion progression in vitro. *J Dent Res* 1984; 63 (11):1276-8.

Wigdor HA, Walsh JT, Jr., Featherstone JD, Visuri SR, Fried D, Waldvogel JL. Lasers in dentistry. *Lasers Surg Med* 1995; 16 (2):103-33.

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

Zuerlein MJ, Fried D, Featherstone JD. Modeling the modification depth of carbon dioxide laser-treated dental enamel. *Lasers Surg Med* 1999; 25 (4):335-47.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 148/06

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa "Avaliação *in vitro* do efeito do laser de CO₂, associado ou não à aplicação tópica de flúor, na prevenção de cárie de superfície radicular", de responsabilidade da Pesquisadora **Wanessa Christine de Souza Zaroni**, sob orientação do Professor Doutor **Michel Nicolau Youssef**.

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

São Paulo, 02 de outubro de 2006


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

ANEXO B –Adendo ao Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

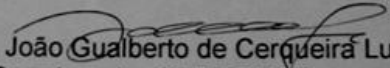


Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO
Protocolo 148/06

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente à mudança do pesquisador do projeto "Avaliação in vitro do efeito do laser CO2, associado ou não à aplicação tópica de Flúor, na prevenção de cárie superficial radicular", a partir de agora de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Fernando Seishim Hanashiro, sob orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) Michel Nicolau Youssef.

São Paulo, 02 de abril de 2009.


Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador CEP/FOUSP

Av. Prof. Lincu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira".
São Paulo - SP - CEP 05508-900 - FAX (0XX11) 3091-7887.

ANEXO C - Parâmetros estatísticos para as múltiplas comparações do teste de Games & Howell

(I) Grupos	(J) Grupos	Diferença das médias (I-J)	Erro Padrão	valor-P	Lim.Inf.	Lim.Sup.
G1	G2	-0.330333*	0.071442	0.004386	-0.55827	-0.1024
	G3	-0.343333*	0.068714	0.003414	-0.5677	-0.11897
	G4	-0.296333*	0.083968	0.018899	-0.55178	-0.04089
	G5	-0.305333*	0.077525	0.009896	-0.5449	-0.06576
G2	G1	0.330333*	0.071442	0.004386	0.102397	0.558269
	G3	-0.013	0.032865	0.994298	-0.11369	0.087691
	G4	0.034	0.058388	0.975505	-0.14871	0.216709
	G5	0.025	0.048668	0.984713	-0.12444	0.174437
G3	G1	0.343333*	0.068714	0.003414	0.118966	0.5677
	G2	0.013	0.032865	0.994298	-0.08769	0.113691
	G4	0.047	0.055016	0.907693	-0.13009	0.224086
	G5	0.038	0.044567	0.908808	-0.10287	0.178866
G4	G1	0.296333*	0.083968	0.018899	0.040889	0.551777
	G2	-0.034	0.058388	0.975505	-0.21671	0.148709
	G3	-0.047	0.055016	0.907693	-0.22409	0.130086
	G5	-0.009	0.06569	0.999912	-0.20885	0.190847
G5	G1	0.305333*	0.077525	0.009896	0.065762	0.544904
	G2	-0.025	0.048668	0.984713	-0.17444	0.124437
	G3	-0.038	0.044567	0.908808	-0.17887	0.102866
	G4	0.009	0.06569	0.999912	-0.19085	0.208847

* indica diferença estatística significativa $P < 0.05$.