

PATRÍCIA HAYPEK

**INTERAÇÃO DO LASER DE DIODO DE ALTA POTÊNCIA COM A
SUPERFÍCIE RADICULAR. EFEITO NA MORFOLOGIA, NA
VARIAÇÃO DE TEMPERATURA E NA ADESÃO E PROLIFERAÇÃO
DE FIBROBLASTOS EM CULTURA**

São Paulo

2005

Patrícia Haypek

Interação do laser de diodo de alta potência com a superfície radicular. Efeito na morfologia, na variação de temperatura e na adesão e proliferação de fibroblastos em cultura

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

Área de Concentração: Dentística

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Martins Marques

São Paulo

2005

FOLHA DE APROVAÇÃO

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

São Paulo: ___/___/___

Banca Examinadora

1) Prof. Dr.

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof. Dr.

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof. Dr.

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof. Dr.

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof. Dr.

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu amor Eladio Sprotte Filho que me ajudou a encontrar a verdadeira fórmula simples e feliz de viver. As nossas vidas se completam. Obrigada por me incentivar com seu amor.

A Mariah que Deus me presenteou como que um anjo.

Aos meus pais Stefan e Susana que foram exemplo para a minha formação. Muito obrigada por me orientarem no caminho da luz.

A minha querida irmã Erika que sempre foi minha companheira alegre nos momentos de risos de nossa infância.

À minha mãe Eli Teresinha que onde estiver tenho a certeza que me guia e protege. Apesar do pouco tempo seu exemplo e sua memória estão sendo seguidos.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Márcia Martins Marques que me amparou no trabalho, conduzindo-me à pesquisa e ao trabalho científico de forma única e exemplar.

Ao Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo que durante 13 anos me orientou e me guiou no caminho do conhecimento, da dedicação, do desempenho, da atuação clínica e da vida acadêmica foi o exemplo de seriedade e responsabilidade.

A Profa. Dra. Maria Denise Zezell que me orientou na etapa básica e inicial do trabalho e com a qual já compartilhei fundamentos importantes para a minha formação acadêmica.

A Profa. Dra. Maria da Graça Naclério-Homen que em muito me incentivou nesse momento da minha vida tanto pessoal quanto profissional e acadêmica. A sua orientação sem dúvida foi muito importante.

Ao Prof. Dr. Luciano Bachmann que sempre foi um companheiro de trabalhos científicos e laboratoriais.

Ao meu pai Stefan Haypek pela incansável revisão do texto.

Ao técnico da Patologia Bucal Wilson que fez a primeira etapa da análise em MEV.

Ao Nildemar do Centro de Caracterização Técnica de Materiais do IPEN que fez a segunda etapa da análise em MEV.

Ao Laboratório Especial de Lasers em Odontologia - LELO - FOUSP pela concessão do equipamento de laser de diodo de alta potência utilizado neste trabalho.

Ao Centro de Lasers e Aplicações, IPEN pelo trabalho de análise de temperatura.

A Glauci da SDO pela dedicação no auxílio da formatação final do trabalho.

Ao David Lascalla pela incansável colaboração e apoio sempre que precisei.

Ao serviço de Pós Graduação da FOU SP pela gentileza e atenção sempre que precisei.

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

RESUMO

O objetivo do estudo foi analisar a interação entre o laser de diodo de alta potência e a superfície radicular através da análise de: variação de temperatura (Fase A), morfologia superficial das raízes dentárias (Fase B), adesão e a proliferação de fibroblastos cultivados sobre estas superfícies (Fase C). Vinte e um dentes unirradiculares foram utilizados nas 3 fases dos experimentos. Os grupos experimentais foram: Grupo controle - só recebeu o tratamento inicial de raspagem e alisamento radicular; Grupo INT - recebeu o mesmo tratamento do controle seguido de irradiação com o laser de diodo de alta potência, com comprimento de onda de 808 nm e fibra óptica de 400 µm de diâmetro, posicionada paralela à superfície radicular no parâmetro de 1,5 W (597,1 W/cm² na ponta da fibra) durante 30 s no modo interrompido; e Grupo CW - onde foi usado o mesmo tratamento do grupo INT, porém com o laser no modo contínuo. Na fase A utilizaram-se termopares para monitorar a temperatura intrapulpar; na Fase B, microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies tratadas dos 3 grupos experimentais, e na Fase C, fibroblastos foram plaqueados sobre as superfícies tratadas e em eletromicrografias de varredura as células foram contadas em 24 (adesão), 48 e 72 h (proliferação) após o plaqueamento. A monitoração de temperatura demonstrou que, com os parâmetros utilizados, houve aumento de temperatura dentro dos limites

biocompatíveis e que esse aumento foi significativamente maior no grupo CW do que no grupo INT. Nos grupos irradiados observou-se presença de *smear-layer* modificada, exibindo uma superfície com áreas de aspecto mais liso correspondendo às áreas de fusão e ressolidificação, entremeadas por zonas de aspecto mais corrugado. Túbulos dentinários abertos não foram observados. Os fibroblastos plaqueados sobre as superfícies irradiadas aderiram e aumentaram em número no decorrer do tempo experimental. As curvas de crescimento celular sobre as superfícies irradiadas com os dois modos do laser apresentaram comportamento biológico similar entre si e com o controle. Pode-se concluir, nas condições deste estudo, que o uso do laser de diodo de alta potência é seguro do ponto de vista térmico, e causa alterações morfológicas superficiais similares, independentemente dos modos de irradiação. Adicionalmente, essas superfícies radiculares irradiadas são biocompatíveis, possibilitando a adesão e a proliferação celular.

Palavras-Chave: laser de diodo de alta potência, cultura de células, superfície radicular

Haypek P. Interaction between high power diode laser and dental root surface. Thermal, morphological and biocompatibility analysis [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the interaction between the high power diode laser and the dental root surface through the temperature variation analysis (Step A), root surface morphological observation (Step B), adhesion and proliferation of fibroblasts cultured on the top of the root surfaces (Step C). Twenty-one uniradicular teeth were used in the 3 steps of the experiments. The experimental groups were, as follows: Control group - root planning and scaling using Gracey curets; INT group - the root surfaces received the same treatment as control group followed by laser irradiation (high power diode laser, wavelength 808 nm, 400 µm optical fiber used parallel to the root surface, 1,5 W for 30 s, 597,1 W/cm²), and CW - treated as the INT group however in a continuous wave. For the step A thermocouples were used; for step B, scanning electron microscopy (SEM) of the treated root surfaces of the 3 experimental groups, and at the Step C, fibroblasts were plated on the top of the root surfaces, and in scanning electronmicrographs the attached cells were counted 24 (adhesion), 48 e 72 h (proliferation) after plating. The temperature monitorization showed that, with the parameters used, there was an increase in temperature within the biological safety limits and, this increase was significantly higher for the CW group. At the root surfaces of irradiated groups a modified smear-layer was observed exhibiting rough areas intermingled to smooth areas corresponding to areas of fusion and resolidification of dental hard tissues. Open dentinal tubules were not observed.

The fibroblasts plated on the top of the irradiated surfaces adhered and proliferated throughout the experimental time (0 to 3 days). The growth curves of the irradiated groups, independently of the irradiation mode, showed biological behavior similar between them and with the control group. At the conditions of this study, we concluded that the use of high power diode laser for root surface conditioning is thermally safe and causes similar superficial morphological changes independently of the irradiation mode used. Additionally, these root surfaces are biocompatible because did not impair the cell adhesion and growth.

Keywords: diode laser, cells culture, root surface

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 2.1 - Gráfico de absorção de diferentes comprimentos de onda e cromóforos absorvedores (MALDONADO; RIBEIRO; ZECELL, 2000)25
- Figura 4.1 - Dente posicionado no interior do banho térmico, com o termopar posicionado no interior da câmara pulpar e a fibra óptica sobre a superfície radicular simulando a irradiação37
- Figura 4.2 - Etapa da monitoração de temperatura39
- Figura 4.3 – Esquema para obtenção dos fragmentos: A - Dente inteiro. B - Secção longitudinal da raiz de vestibular para palatina. C - Vista proximal do dente com secção a 7 mm da JEC; D - Secção de 1 mm da JEC resultando em duas amostras com 6 mm de comprimento; E – Duas amostras das proximais do mesmo dente e aplainamento das faces internas (parede pulpar); F - Aspecto final das amostras com aproximadamente 6 mm x 5 mm40
- Figura 5.1- Representação gráfica do aumento de temperatura em °C durante as irradiações nos modos contínuo e interrompido. (a) significativamente diferente do grupo contínuo ($p < 0,05$)47
- Figura 5.2 - Eletromicrografias de varredura de superfícies cementárias irradiadas com o laser de diodo nos modos interrompido (A e B) e contínuo (C e D)50
- Figura 5.3 - Eletromicrografias de varredura das superfícies radiculares irradiadas com o laser de diodo no modo interrompido (A - C), e contínuo (D - F). Sobre as superfícies observam-se os fibroblastos após um (A e D), dois (D e E) e três (C e F) dias após o seu plaqueamento51
- Figura 5.4 - Representação gráfica do número de células presentes nas superfícies radiculares irradiadas em função do tempo e desvio padrão52

Figura 5.5 - Representação gráfica do número de células em função do tempo crescidas sobre superfícies radiculares não irradiadas (controle), e irradiadas nos modos contínuo e interrompido. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$)52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 - Comparação das diferenças entre as médias dos valores correspondentes ao aumento de temperatura (°C) segundo o teste t de Student48
- Tabela 5.2 - Comparação das diferenças entre as médias dos valores correspondentes ao número de células aderidas aos fragmentos de raízes dentárias dos diferentes grupos experimentais pelo teste ANOVA complementado pelo teste de Tukey53
- Tabela 5.3 - Comparação das diferenças entre as médias dos valores correspondentes ao número de células aderidas aos fragmentos de raízes dentárias dos grupos experimentais e controle pelo teste ANOVA complementado pelo teste de Tukey55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCTM	Centro de Caracterização Técnica de Materiais, IPEN / CNEN - SP
CLA	Centro de Lasers e Aplicações, IPEN
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CO ₂	dióxido de carbono
CW	do inglês <i>continuous wave</i> ou onda contínua
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
Er	érbio
Er:YAG	matriz hospedeira YAG dopada com Er
et al.	do latim et alii ou e outros
EUA	Estados Unidos da América
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
HMDS	hexadimetil disilazona
Ho	hólmio
Ho:YAG	matriz hospedeira YAG dopada com Ho
INT	Interrompido
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
JEC	junção esmalte-cimento
LASER	acrônimo do inglês <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> ou amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
LELO	Laboratório Especial de Lasers em Odontologia
LMF	linhagem celular de fibroblasto de mucosa mastigatória humana.

MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Nd	neodímio
Nd:YAG	matriz hospedeira YAG dopada com Nd
p/a	para a
PBS	do inglês <i>phosphate-buffered saline</i> ou solução tampão fosfato salina
PBSA	do inglês <i>phosphate-buffered saline absent</i> ou solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio
pH	potencial hidrogeniônico
qcw	quasi-contínuo
RAR	raspagem e alisamento radicular
<i>S. sanguis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
SEM	do inglês <i>scanning electron microscopy</i> ou microscopia eletrônica de varredura
UniFMU	Centro Universitário Faculdade Metropolitanas Unidas
USP	Universidade de São Paulo
Y	ítrio
YAG	do inglês <i>Yttrium Aluminum Garnet</i> ou granada de ítrio e alumínio

LISTA DE SÍMBOLOS

mm	milímetro
°C	graus Celsius ou graus centígrados
<	menor
p	probabilidade
%	por cento
mJ/pulso	miliJoule por pulso
Hz	Hertz
W	Watt
nm	nanômetro
ms	milissegundo
s	segundo
mJ	miliJoule
+/-	mais ou menos
µm	micrômetro
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
mW/cm ²	miliwatt por centímetro quadrado
W/cm ²	Watt por centímetro quadrado
n ^o	número
=	maior ou igual
mW	miliWatt
g	grama

mL	mililitro
M	molaridade
A	área
E	energia
P	potência
L	litro
h	hora
J	Joule
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
m	metro
min	minuto
mm/s	milímetro por segundo
pps	pulso por segundo
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
µs	microssegundo
ns	nanossegundo

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
3 PROPOSIÇÃO	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Material.....	35
4.2 Métodos.....	38
5 RESULTADOS	47
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICES	71
ANEXOS	74

1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo do tratamento periodontal é restabelecer e manter a saúde do periodonto através da remoção e controle do agente etiológico. No tratamento da superfície radicular a remoção do biofilme e do cálculo dental, bem como do cimento e da dentina contaminados pelas toxinas liberadas pelos microrganismos, é um fator que vai interferir no êxito da terapia proposta ao paciente (THEODORO, 2001; FEIST, 2002).

O tratamento da doença periodontal está baseado na remoção do material contaminante sobre a superfície radicular através de métodos mecânicos de remoção, como as raspagens manuais utilizando os diversos instrumentos periodontais. Esses métodos são comprovadamente eficazes e de vital importância no êxito do tratamento; porém, sabe-se da dificuldade de acessar áreas limítrofes da anatomia dental, como regiões de furcas ou de anomalias de forma, ou até mesmo concavidades acentuadas e bolsas com profundidade maior que 6 mm (COBB, 1996, FEIST, 2002). Portanto, em alguns casos, o tratamento periodontal convencional necessita de terapias coadjuvantes que possam acessar essas regiões limítrofes.

Diversos estudos na área de microbiologia bucal comprovam a eficácia da utilização da luz laser como coadjuvante no auxílio da eliminação de agentes patológicos. Dependendo da área a ser irradiada, há comprimentos de ondas específicos, relacionados à interação luz–tecido alvo (ABSTEN; JOFFE, 1963; MALDONADO; RIBEIRO; ZEZELL, 2000; EDUARDO; PELINO; HAYPEK, 2001; EDUARDO; GOUW-SOARES; HAYPEK, 2002). O laser corretamente absorvido no

tecido pode reduzir a quantidade de microrganismos, através da elevação da temperatura. Dependendo do agente agressor, uma temperatura em torno de 45 °C já pode causar danos na membrana citoplasmática do microrganismo. A ação da luz laser sobre a destruição de endotoxinas na intimidade tecidual também é um fator de elevada importância, favorecendo a eliminação do foco infeccioso (MORITZ et al., 1997a, 1997b, 1997c; ANTENUCCI, 2000).

Na prática periodontal ou periimplantar a literatura comprova a eficácia da redução microbiana utilizando os lasers de neodímio, diodos de alta potência e hólmio (MORITZ et al., 1997b, 1997c; BADER, 2000; ROMANOS, 2001). Os comprimentos de onda dos lasers de érbio e dióxido de carbono também são eficazes na descontaminação das bolsas periodontais ou periimplantares (EDUARDO; GOUW-SOARES; HAYPEK, 2002; PURUCKER et al., 1998; MOUHYI; SENNERBY; RECK, 2000; HAYPEK, 2001).

Além da ação antimicrobiana (MORITZ et al., 1998), o condicionamento da superfície radicular pelos lasers também tem sido apresentado como terapia coadjuvante ao tratamento, promovendo o aumento da adesão e proliferação de fibroblastos (FEIST, 2002).

Os estudos da tecnologia laser aperfeiçoam-se com os anos, assim como os investimentos das empresas fabricantes têm sido sempre maiores. Os lasers de diodo de alta potência são amplamente divulgados por serem semicondutores e conseqüentemente possibilitarem a compactação dos equipamentos com potências suficientes para uma atividade clínica adequada. Há ainda muito a pesquisar sobre os diodos de alta potência e suas diversas interações com os tecidos dentais (ROMANOS, 2001; MORITZ et al., 1997b, 1997c).

A biocompatibilidade da superfície radicular irradiada com laser de diodo de alta potência foi avaliada através da adesão e proliferação de fibroblastos de gengiva humana, respeitando-se a variação de temperatura durante a irradiação e analisando-se as alterações superficiais do tecido alvo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Interação da luz laser sobre os tecidos duros dentais

Os lasers de alta potência podem causar elevação de temperatura sobre os tecidos alvos durante a irradiação. Há a necessidade de utilização de parâmetros corretos na utilização clínica dos diversos lasers em Odontologia.

O tratamento de tecidos duros dentais requer cuidados de controle de variação de temperatura respeitando-se o tecido pulpar e periodontal. Um aumento de temperatura da polpa acima de 5,5 °C provoca a necrose pulpar, segundo Zach e Cohen (1965), e ainda, segundo Eriksson e Albrektsson (1983), o aumento acima de 11,1 °C na superfície radicular externa, durante 1 minuto, provoca a necrose do ligamento periodontal com anquilose e reabsorção radicular externa (trabalho realizado em dentes de macaco Rhesus). Baldissara, Catapano e Scotti (1997) realizando o experimento em dentes humanos, buscou estabelecer parâmetros para as atividades clínicas que poderiam injuriar os tecidos dentais, como os preparos realizados em alta rotação para coroas protéticas. A combinação de análise histológica e clínica tornou-se um método de maior precisão para determinar os parâmetros para danos térmicos pulpares, sendo que o limite de 11,2 °C, por exemplo, não se apresentou como danoso ao tecido pulpar.

Desde a década de 1960, quando Maiman fez o primeiro laser, um laser de rubi, diversos comprimentos de onda foram estudados para possibilitar o uso seguro dos equipamentos (AOKI et al., 2000). Os tecidos moles da cavidade bucal podem

ser vaporizados, incisionados, ablacionados e até carbonizados quando irradiados com comprimentos de onda como os dos lasers de CO₂, diodos de alta potência, érbio, neodímio ou argônio. A utilização clínica dos lasers pode ocorrer como coadjuvante em diversos tratamentos nas áreas de cirurgia, periodontia, prótese e odontopediatria (EDUARDO; GOUW-SOARES; HAYPEK, 2002).

Os lasers de neodímio, diodos de alta potência, hólmio e érbio podem ser utilizados como coadjuvantes em tratamento endodôntico (AOKI et al., 2000). O aumento de temperatura na superfície externa radicular pode ser controlado utilizando-se um parâmetro adequado, e a fibra do laser percorrendo o interior do conduto com movimentos helicoidais sobre as paredes internas (COHEN; DEUTSCH; MUSIKANT, 1996). Dessa maneira, o limite térmico é respeitado, não ocorrendo dano térmico na região do cimento radicular. O resultado dessa irradiação comprova, através da observação em microscopia eletrônica de varredura, a eficiência dos lasers de hólmio e érbio na remoção dos *debris* e *smear-layer* das paredes internas do conduto radicular (NUBLER-MORITZ et al. 1997). Observa-se uma superfície dentinária radicular limpa, com túbulos dentinários abertos, porém alternando com áreas morfológicamente inalteradas, correspondentes às regiões onde não houve irradiação. Seguindo essa mesma interação laser e tecido mineralizado, o laser de érbio pode também ser utilizado para auxiliar na remoção de *smear layer* da superfície radicular (THEODORO, 2001).

2.1.1 Lasers de diodo de alta potência

O laser de diodo é relativamente novo no tratamento odontológico, demonstrando diversas aplicações em cirurgia bucal. A tecnologia dos semicondutores torna-os práticos e portáteis para o uso na clínica diária. Os equipamentos de diodo foram desenvolvidos de acordo com considerações econômicas e ergonômicas, resultando em custos reduzidos em comparação a outros equipamentos lasers (ROMANOS; KARMAN; NENTWIG, 1998; ROMANOS; NENTWIG, 1999).

De uma maneira geral os lasers necessitam de um gasto energético muito alto para transformarem sua fonte de alimentação, geralmente elétrica, em energia óptica. Alguns lasers apresentam no máximo 3 % de rendimento da energia elétrica. No entanto o laser de diodo ou semicondutor atualmente é o que apresenta maior eficiência elétrica, atingindo marcas de 40 %.

O laser de diodo de alta potência apresenta o seu comprimento de onda final determinado de acordo com as características da constituição do semicondutor. O sistema do laser consiste em um pequeno cubo de proporções submilimétricas, formado por material semicondutor, responsável por converter a energia elétrica em energia luminosa. Essa energia é emitida em feixe por uma das faces desse pequeno cubo, e caracteriza-se por apresentar no máximo uma potência de poucos Watts (W). Um laser de diodo de alta potência necessita de pelo menos um número aproximando de vinte desses cubos. Todos são crescidos lado a lado e em único passo, aumentando a potência final dos mesmos, formando uma barra de diodo. Há geração de calor durante a utilização do equipamento, havendo a necessidade de

dissipação, auxiliada por um bloco de cobre prensado junto à barra de diodo (QUINTO JR., 2001).

Os equipamentos de lasers de diodo de alta potência geralmente estão compreendidos em comprimentos de onda que variam desde o visível (0,4 μm) até a faixa do infravermelho próximo não ionizante (+/- 0,9 μm) do espectro eletromagnético (Figura 2.1) (MALDONADO; RIBEIRO; ZECELL, 2000). Eles podem ser emitidos em modo contínuo ou interrompidos, de acordo com a indicação clínica, e em modo contato ou não contato com o tecido alvo. O sistema de entrega do feixe, através de fibra óptica, é indicado para diferentes aplicações cirúrgicas como frenotomias, excisão de tecido mole, hiperplasias gengivais e vestibuloplastias. (ROMANOS; NENTWIG, 1999; AOKI et al., 2000).

Todos os comprimentos de onda dos lasers de diodo são altamente absorvidos por tecidos pigmentados. Os tecidos pigmentados podem possuir cromóforos absorvedores como a hemoglobina ou a melanina que promovem uma boa absorção dos comprimentos de onda dos lasers de diodo de alta potência (Figura 2.1). A qualidade da incisão e a profundidade de penetração da luz laser devem sempre ser consideradas durante a utilização do equipamento, evitando a necrose dos tecidos duros adjacentes (MALDONADO; RIBEIRO; ZECELL, 2000; ROMANOS; KARMAN; NENTWIG, 1998; AOKI et al., 2000).

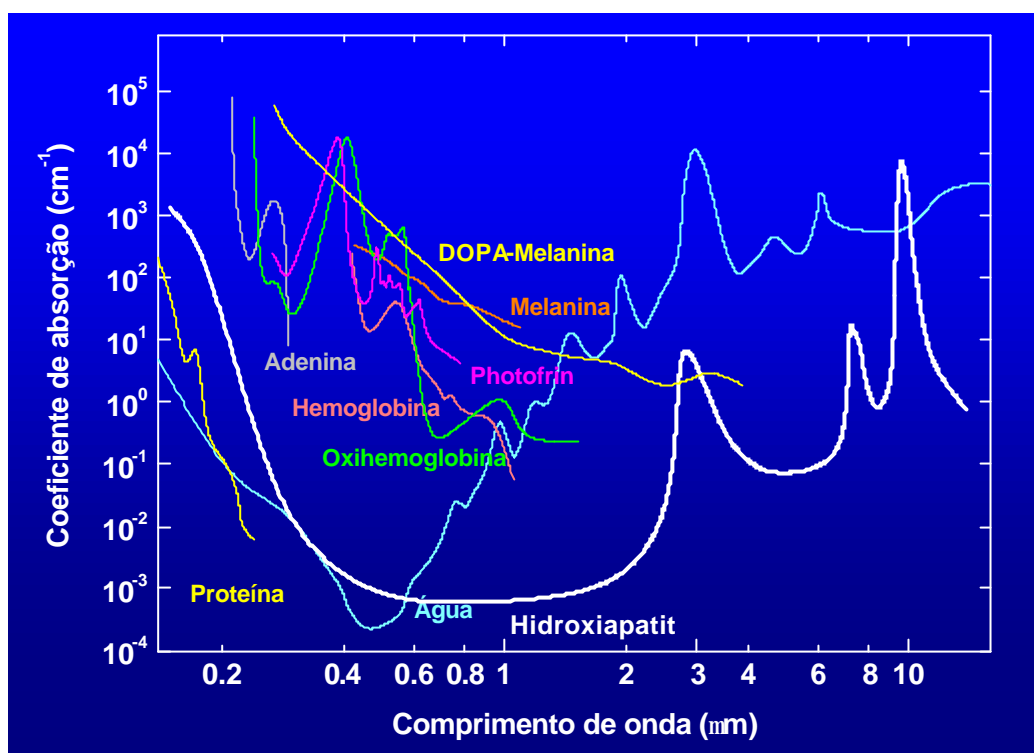


Figura 2.1 - Gráfico de absorção de diferentes comprimentos de onda e cromóforos absorvedores (MALDONADO; RIBEIRO; ZECELL, 2000)

O parâmetro de um feixe de diodo pode ser regulado por um tempo útil de emissão. O seu regime de operação não é o pulsado usualmente encontrado nos lasers comerciais odontológicos. O laser de diodo de alta potência apresenta um regime interrompido *quasi-contínuo* (qcw), com a potência pico do pulso não ultrapassando o limite estabelecido de potência no *display* do equipamento (QUINTO JR., 2001).

Os lasers de diodo de alta potência, quando irradiados sobre os tecidos duros dentais, podem ablacionar o esmalte e a dentina. Pode-se utilizar um cromóforo absorvedor, idocianina verde por exemplo, antes da irradiação com o laser sobre cavidades provocadas por cárie, com o objetivo de proporcionar maior percentual de absorção do feixe sobre os tecidos. As alterações geradas sobre o tecido são dependentes da distribuição da energia entregue e da variação da temperatura

durante a irradiação, respeitando-se os limites seguros de utilização (McNALLY; GILLINGS; DAWES, 1997). Superfícies homoganeamente ressolidificadas, com áreas de fusão e pouca evaporação observadas em MEV, permitem concluir que o laser de diodo de alta potência pode promover a fusão do esmalte dental, dependendo dos parâmetros de irradiação. (AOKI et al., 2000).

A monitoração de temperatura durante o trabalho com laser deve sempre ser considerada, quer seja sobre os tecidos moles da cavidade bucal ou sobre os tecidos duros. A variação da temperatura na câmara pulpar durante a irradiação com laser de diodo de alta potência de 830 nm sobre o esmalte dental de dentes incisivos bovinos foi avaliada utilizando-se os parâmetros de 1 e 2 W, durante 10 segundos de irradiação em modo contínuo. Tinta preta foi utilizada como fotoabsorvedor. Foram posicionados dois termopares, um no meio da câmara pulpar e outro na parede da câmara pulpar, próximo à irradiação. Os resultados demonstraram que os termopares apresentaram valores diferentes em todos os ensaios. O que estava acoplado junto à parede de dentina registrou as maiores temperaturas, indicando que há grandes variações espaciais de temperatura na câmara pulpar. O estudo concluiu que o parâmetro de 1 W foi seguro em sua utilização. O autor ressaltou necessidade de novos estudos para a determinação de parâmetros seguros. (MACRI, 2001)

A utilização do laser de diodo de alta potência, 960 nm, na área de prevenção também oferece resultados que favorece a incorporação de flúor sobre a superfície de esmalte dental. Com o auxílio de um fotoabsorvedor e fibra óptica sem contato, as densidades de energia utilizadas resultaram em superfícies homogêneas e solidificadas, com o decréscimo na porosidade e rugosidade (OLIVEIRA et al., 2000). O laser de diodo pode promover fusão da superfície do esmalte apresentando

uma pequena elevação de temperatura, respeitando-se os limites de dano pulpar, ficando abaixo dos mesmos, quando utilizado com parâmetros adequados e com a fibra óptica em contato com a superfície dental. A fusão e a ressolidificação da superfície do esmalte irradiado com laser são capazes de produzir uma superfície mais resistente à ação de ácidos, podendo essa alternativa terapêutica auxiliar na prevenção de cárie (QUINTO JR. et al., 2001; AZEVEDO, 2002).

Somado aos fatores já descritos pode-se também alcançar uma ação bactericida já comprovada *in vitro*, após a irradiação do laser de diodo no interior de canais radiculares contaminados. Ao microscópio eletrônico de varredura pode-se observar uma superfície dentinária com vedamento dos túbulos dentinários, apresentando aspecto de fusão e recristalização (MORITZ et al., 1997b). O laser de diodo de alta potência pode ser considerado um instrumento útil na desinfecção de canais contaminados quando comparado com os resultados da técnica endodôntica convencional (MORITZ et al., 1997c; RADAELLI, 2002). A utilização do laser de diodo de alta potência pode eliminar microorganismos que migraram para o interior dos túbulos dentinários dos condutos radiculares, aumentando o sucesso da terapia endodôntica (GUTKNECHT et al., 2004, 2005).

Na periodontia o efeito em longo prazo da terapia realizada com laser de diodo em bolsas foi avaliado levando-se em consideração a capacidade bactericida e as propriedades de regeneração do comprimento de onda do laser de diodo de alta potência. O sistema de entrega do feixe através de fibra óptica flexível e em contato favorece sua utilização na profundidade do sulco e bolsa periodontais (AOKI et al., 2000). A redução microbiana foi significativamente maior que os resultados da terapia convencional, resultando numa redução do índice de sangramento e na profundidade das bolsas (MORITZ et al., 1998).

A utilização clínica do laser de diodo de alta potência auxiliando a raspagem e alisamento radicular convencionais pode-se tornar um dos métodos não cirúrgicos mais recentes no tratamento periodontal. Há a necessidade de determinar os efeitos de cada tipo de laser na eficácia do tratamento para se obter um resultado satisfatório e melhor do que o método tradicional (BORRAJO et al., 2004).

As possíveis alterações morfológicas na superfície cementária radicular depois de irradiadas com laser de diodo de alta potência de 809 nm foram avaliadas por Kreisler et al. (2002). O estudo foi realizado *in vitro*. Os dentes extraídos por comprometimento periodontal tiveram a superfície radicular raspada e alisada com curetas. Os parâmetros de potência utilizados variaram entre 0,5 W e 2,5 W. O laser foi emitido em modo contínuo e o tempo de exposição variou entre 10 e 30 segundos por amostra. As superfícies foram secas ou umedecidas com solução salina e película de sangue humano na superfície radicular, sendo investigadas e analisadas através da microscopia convencional. Os espécimes foram fotografados antes e depois da utilização do laser. As amostras que apresentaram alterações morfológicas foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura. Os resultados apresentaram variações: as amostras secas ou umedecidas com solução salina não sofreram alterações em nenhuma das variações dos parâmetros utilizados. As amostras cobertas por fina película de sangue humano, dependendo das potências usadas, apresentaram alterações severas na superfície radicular. Os parâmetros de 1 W ou menos demonstraram pouco ou nenhum efeito destrutivo ou negativo na superfície, principalmente se comparado com os parâmetros de 1,5, 2,0 e 2,5 W, que apresentaram resultados parciais ou totais de carbonização quando cobertos por película de sangue. O ângulo de contato da fibra com a superfície radicular também foi importante para os resultados dos efeitos deletérios (90° e 10°).

Os autores concluíram que o laser de diodo pode causar sérios problemas sobre os tecidos mineralizados se os parâmetros não forem corretos.

O uso do laser de Er:YAG em comparação ao laser de diodo de alta potência e os métodos convencionais para remoção de cálculo subgingival demonstrou que o laser de Er:YAG apresenta resultados comparáveis aos convencionais, enquanto que o de diodo para a remoção de cálculo não foi um opção favorável (SCHWARZ et al., 2003). Pode-se também optar por uma utilização em conjunto do método convencional com instrumentos manuais e a irradiação com o laser de érbio na seqüência (CRESPI et al., 2005).

O laser de Er:YAG também foi avaliado em comparação com laser de diodo de alta potência irradiando superfícies radiculares de dentes humanos e acompanhando a variação de temperatura intrapulpar. (THEODORO, 2003). Os procedimentos convencionais de raspagem e alisamento foram realizados com instrumentos manuais e as superfícies foram irradiadas com os diferentes lasers, monitorando-se a temperatura. Foram utilizados os parâmetros para o laser de Er:YAG, de 100 mJ e 10 Hz, durante 30 segundos; e para o laser de diodo (810 nm), os parâmetros utilizados foram de 1.0 W e de 1,4 W, interrompido em 0.05 ms durante 30 segundos. A análise térmica revelou, para o laser de érbio, uma taxa de variação de $- 2,2 \pm 1,5$ °C; e para o laser de diodo, a taxa foi de $1,6 \pm 0,8$ °C no parâmetro de 1,0 W, e no parâmetro de 1,4 W, a taxa foi de $3,3 \pm 1,0$ °C. Pode-se concluir que as irradiações, tanto com o laser de Er:YAG quanto com o laser de diodo, não induziram altas temperaturas intrapulares. As eletromicrografias demonstraram não haver mudanças morfológicas superficiais como fusão ou derretimento cementário significantes em qualquer um dos grupos; entretanto, no

grupo do uso do laser de Er:YAG as superfícies demonstraram-se mais irregulares, mais pronunciadas.

Gulin (2003), também avaliou a alteração morfológica da superfície cementária irradiada com laser de diodo de 808 + ou - 10 nm, aferindo também a variação de temperatura durante a irradiação com laser nos parâmetros utilizados no estudo. Foram selecionados 18 dentes. A análise da temperatura foi realizada em três dentes. Os outros 15 foram divididos em seis grupos: C – controle sem tratamento; C1 – controle que recebeu apenas raspagem e alisamento convencional com curetas no sentidoápico oclusal nas faces vestibular e lingual; L1 – laser 1,0 W; L2 – laser 1,2 W; L3 – laser 1,4 W e L4 – laser 1,6 W. Todos os dentes irradiados foram inicialmente submetidos ao mesmo tratamento que o grupo C1. O laser foi irradiado no sentidoápico-cervical e méso-distal por duas vezes durante 10 segundos com intervalos de 20 segundos entre uma irradiação e outra, no modo contínuo, com a fibra em contato formando um ângulo de 5 ° com a superfície cementária. Os resultados de variação de temperatura demonstraram que houve um aumento de temperatura superior a 5,5 °C. A análise da morfologia apresentou no grupo controle C1 a formação de *smear-layer*; as amostras do grupo 1 W apresentaram maior lisura e homogeneidade da superfície radicular, e os grupos 1,2 W, 1,4 W e 1,6 W apresentaram ranhuras evidentes e intercaladas com áreas lisas homogêneas, com menos *smear-layer* quando comparada com os grupos controle. O autor sugere a necessidade de novos estudos para avaliar o laser de diodo no modo interrompido de irradiação.

A utilização do laser de diodo sobre os tecidos moles da cavidade oral há alguns anos vem sendo comprovada através de publicações. Uma das opções na prática clínica periodontal é utilizar os lasers de diodo de alta potência para remoção

do epitélio interno da bolsa. O objetivo do tratamento periodontal está em reduzir os depósitos de microorganismos na profundidade dos sulcos e bolsas periodontais. Diversos métodos de tratamentos cirúrgicos buscam o controle da migração epitelial promovendo uma formação de tecido conjuntivo de conexão. Através de achados histológicos em animais, pode-se concluir que a manipulação dos tecidos moles periodontais, através da irradiação com laser de diodo de alta potência, promove a total remoção epitelial em comparação com os métodos com instrumentos manuais (ROMANOS et al., 2004).

2.2 Estudos sobre culturas de células e superfícies radiculares

A adesão e o crescimento de fibroblastos de gengiva humana sobre superfícies radiculares expostas à doença periodontal depende da remoção dos materiais tóxicos ou do próprio cimento doente (ALEO; DE RENZIS; FARBER, 1975; TERRANOVA; MARTIN, 1982). A possibilidade de orientação de fibroblastos de gengiva humana e das novas fibras colágenas são alcançadas mais rapidamente quando se utilizam em estudo *in vitro* raízes desmineralizadas (PITARU; MELCHER, 1983).

Trylovich et al.(1992) avaliaram o efeito da irradiação com laser de Nd:YAG sobre superfícies radiculares através da adesão de fibroblastos de gengiva humana. Dentes sadios foram seccionados em fragmentos de 4 mm x 4 mm e divididos em três grupos: controle, sem tratamento; tratamento com endotoxina ou tratamento com endotoxina mais laser. Todos os espécimes foram submersos em uma solução

de *E. coli* durante 72 horas. O grupo laser Nd:YAG foi irradiado com 80 mJ de energia e 10 Hz de frequência, através de uma fibra óptica de 320 μm de diâmetro posicionada perpendicularmente à superfície, durante 1 minuto. Os fragmentos foram plaqueados com $2,5 \times 10^5$ células e incubados por 40 horas e posteriormente processados para análise em MEV. O grupo tratado com endotoxina e laser apresentou um número de células significativamente menor do que os outros grupos. As superfícies tratadas com o laser apresentaram áreas de carbonização, com formação de crateras e trincas e presença de derretimento do cimento. Os autores sugeriram que o tratamento com o laser de Nd:YAG, dentro dos parâmetros desse estudo, alterou a biocompatibilidade da superfície cementária, tornando-a desfavorável à adesão de fibroblastos.

Kreisler et al. (2001) avaliaram os efeitos do laser de diodo de alta potência de comprimento de onda de 810 nm sobre a taxa de sobrevivência de fibroblastos gengivais em cultura. As células foram plaqueadas sobre os fragmentos e depois de incubadas e atingido o estado de confluência o meio de crescimento foi removido para a realização da irradiação com laser. Foram utilizadas potências variando de 0,5 W a 2,5 W, em modo contínuo de irradiação com a fibra perpendicular à superfície com uma distância de 0,5 mm em movimentos circulares, variando também o tempo de exposição de 60 a 240 segundos. Na dependência dos parâmetros utilizados, os resultados demonstraram que houve uma redução no número de células. O tempo de exposição foi mais relevante que a potência utilizada. Os autores concluíram que a utilização do laser de diodo para a descontaminação de bolsa periodontal pode ser prejudicial ao periodonto na dependência da potência e tempo de exposição. Os autores finalizam recomendando realização de novos estudos para determinar parâmetros seguros na

utilização do comprimento de onda no interior de bolsas periodontais e tecidos mineralizados.

A adesão e a proliferação de fibroblastos de gengiva humana sobre superfícies radiculares tratadas com laser de Er:YAG ou instrumento manual foram estudadas por Feist et al. (2003). Foram selecionados 27 dentes humanos uniradiculares recém-extraídos com doença periodontal. O cálculo da face experimental foi removido utilizando instrumentos manuais. As amostras foram divididas em três grupos experimentais: A – superfícies radiculares aplanadas com cureta Gracey nº 3/4; B – superfícies radiculares irradiadas com laser de Er:YAG (Kavo Key II – Germany) com a ponta periodontal, energia de 35 mJ/pulso, frequência de 10 Hz, irrigação contínua e duas aplicações de 10 segundos cada, com intervalo de 10 segundos; C – superfícies radiculares irradiadas da mesma forma que no grupo anterior, com parâmetro de energia de 59 mJ/pulso. Os dentes foram preparados em fragmentos de 5 mm x 6 mm, autoclavados e plaqueados com 1×10^3 células e acompanhados por um, dois e três dias. Os espécimes foram analisados em MEV, após processamento específico, e a contagem de células foi feita sobre as eletromicrografias com o auxílio de uma grade quadriculada. Os autores concluíram que os fibroblastos aderiram e cresceram sobre todas as superfícies tratadas; porém, as superfícies tratadas com laser Er:YAG 35 mJ/pulso (60 mJ/pulso no *display* do equipamento) favoreceram a adesão e a proliferação de fibroblastos, comparadas às superfícies tratadas com aplanamento radicular com curretas ou com o laser de Er:YAG no parâmetro de 59 mJ/pulso (100 mJ/pulso no *display* do equipamento).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do trabalho foi analisar a interação entre o laser de diodo de alta potência e a superfície radicular de dentes humanos *in vitro*. Essa análise se baseou na avaliação da alteração de temperatura, da morfologia superficial das raízes dentárias, além da adesão e a proliferação de fibroblastos cultivados sobre estas superfícies.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em três etapas distintas.

Fase A: monitoração de variação de temperatura durante a irradiação.

Fase B: irradiação das amostras dentro dos seus respectivos grupos e observação morfológica das superfícies irradiadas.

Fase C: análise da biocompatibilidade através da contagem de fibroblastos de gengiva humana sobre as superfícies raspadas com os instrumentos manuais ou laser de diodo (adesão e proliferação).

O material e os métodos aqui apresentados foram os mesmos utilizados por Feist (2002), com algumas modificações como por exemplo o tipo de laser e os parâmetros.

4.1 Material

- **Dentes humanos**

Foram utilizados 21 dentes recém-extraídos por motivo de doença periodontal. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da FOUSP (Parecer nº 73/03 Protocolo nº 67/03) (Anexo A). Os dentes foram obtidos do Banco de Dentes Permanentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo B), e da Clínica de Cirurgia da UniFMU (Anexo C).

Os dentes coletados após a exodontia e utilizados neste estudo foram selecionados segundo os critérios de inclusão e exclusão enumerados a seguir:

Determinantes de inclusão:

- 1) Diagnóstico de doença: Periodontite Crônica (ARMITAGE,1999) ou Periodontite do Adulto (TODESCAN, 2001);
- 2) Dentes unirradiculares com cálculo visível;
- 3) Aspecto radiográfico: perda óssea \geq a 50 % do comprimento total da raiz;
- 4) Vitalidade pulpar.

Determinantes de exclusão:

- 1) Dentes que foram raspados no último ano ou submetidos à cirurgia periodontal dentro dos últimos dois anos;
- 2) Dentes que apresentarem cárie e/ou restauração na região da junção esmalte-cimento ou na superfície radicular;
- 3) Desvitalizados ou necrosados.

Todos os dentes foram autoclavados e armazenados em frascos contendo solução tampão fosfato salina (PBS), dentro do refrigerador (a uma temperatura de 4° C) até o processamento dos mesmos.

• **Laser de diodo**

Foi utilizado um equipamento de laser de diodo de alta potência Zap Laser (Pleasant Hill, California, EUA). O equipamento de diodo emite no comprimento de onda de 808 nm \pm 5, e potência variando de 0 a 3,5 W, tendo como feixe guia um outro diodo de 635 nm com potência máxima de 3 mW. Os sistemas de entrega do feixe podem ser por fibra óptica de quartzo e sílica de 400 μ m de diâmetro, ou de

600 μm de diâmetro. O laser pode ser emitido em modo contínuo de operação ou interrompido em uma frequência de 10 Hz, com ciclo útil de 50 %.

- **Sistema de avaliação de variação de temperatura**

Foi utilizado um banho térmico durante a irradiação. Para a detecção da variação da temperatura foram utilizados termopares de cromel-alumel tipo “K”, acoplados a um sistema de aquisição e armazenamento de dados, os quais foram analisados através de um programa de computador (Figura 4.1). O tempo de resposta do sistema é 0,2 s e a precisão de 0,1 °C.

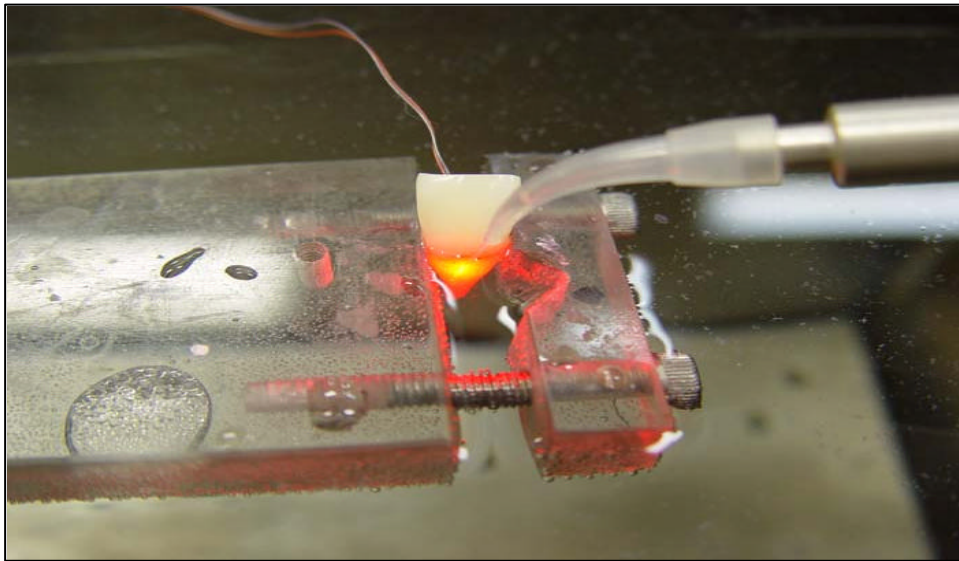


Figura 4.1 - Dente posicionado no interior do banho térmico, com o termopar posicionado no interior da câmara pulpar e a fibra óptica sobre a superfície radicular simulando a irradiação

- **Cultura de células**

A linhagem celular LMF estabelecida a partir de um fragmento de gengiva humana (ALMEIDA-LOPES et al., 2001) foi utilizada nesse estudo.

4.2 Métodos

Os 21 dentes tiveram o cálculo visível removido com cureta de Gracey n.º 3/4, através de movimentos de tração vertical. Após o tratamento prévio convencional foi realizado o tratamento específico de cada grupo experimental.

Os 21 dentes foram divididos em quatro grupos que foram utilizados nas três etapas do trabalho. Essa divisão foi feita de forma que para cada estudo houvesse a representação de dentes de comprimentos variados - incisivos, caninos e pré-molares. Além da uniformidade entre os tipos de dentes, as diferentes quantidades de cálculo existentes também foram levadas em consideração.

Seis dentes foram utilizados para a análise de temperatura na primeira etapa do experimento (Fase A).

As etapas seguintes do experimento foram realizadas com os 15 dentes dos três grupos restantes. Uma amostra de cada um dos três grupos foi selecionada para a observação morfológica da superfície em microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Fase B). As demais amostras foram utilizadas para a análise do número de células aderidas aos fragmentos dentários nos períodos de um dia (adesão), dois e três dias (proliferação) (Fase C).

- **Fase A: Monitoração de temperatura**

Foram utilizados seis dentes de diferentes grupos (dois incisivos centrais superiores, dois caninos e dois incisivos inferiores), com abertura endodôntica e conduto radicular instrumentado até a lima 40. No interior do conduto foi fixado um

termopar de cromel-alumel tipo “K”, na região central da câmara pulpar de cada dente. A cavidade endodôntica, em todo o seu comprimento, foi preenchida com pasta térmica. Os dentes foram posicionados em banho térmico, com a coroa voltada para cima, e o restante da estrutura dental (porção radicular) submersa, em temperatura próxima da corpórea (36 a 37 ° C). Os dentes foram fixados em um suporte na superfície do recipiente do banho térmico. Ao termopar foi acoplado um sistema de aquisição de dados. A irradiação foi realizada com a fibra de 400 µm em contato e paralela ao longo eixo do dente, na extensão próxima do limite amelo-cementário. Foram padronizados dois tipos diferentes de irradiação: parâmetro de 1,5 W no modo de emissão contínuo; e parâmetro de 1,5 W no modo de emissão interrompido em 10 Hz. Foram realizadas duas irradiações de 15 segundos cada, varrendo a superfície da face vestibular de cada dente, com movimentos horizontais da fibra óptica, paralelamente à superfície radicular, umedecendo a superfície com a água do próprio banho, simulando uma irradiação *in vivo* (Figura 4.2).



Figura 4.2 - Etapa da monitoração de temperatura

Os termopares de cromel-alumel tipo “K” foram acoplados a um sistema de aquisição e armazenamento de dados, os quais foram analisados através de um programa de computador.

• **Fase B: Preparo das amostras e observação morfológica**

As superfícies radiculares dos 15 dentes foram submetidas à RAR (raspagem e alisamento radicular) com cureta de Gracey nº 3/4, através de movimentos de tração vertical no sentido de apical para cervical, sobrepostos, a fim de se obter uma superfície lisa e uniforme. O tempo gasto neste procedimento foi de 1’30” a 2 minutos. Os 15 dentes foram preparados em cortes para possibilitar a utilização das faces proximais dos mesmos, originando 30 amostras. As coroas dos dentes foram mantidas para possibilitar a prensão durante os cortes com os discos (Figura 4.3).

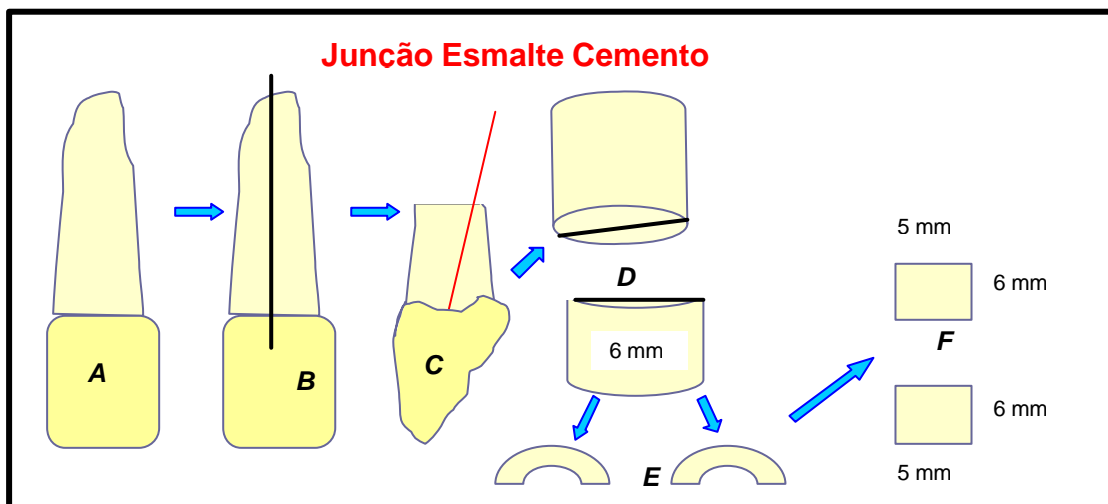


Figura 4.3 - Esquema para obtenção dos fragmentos: A - Dente inteiro. B - Secção longitudinal da raiz de vestibular para palatina. C - Vista proximal do dente com secção a 7 mm da JEC; D - Secção de 1 mm da JEC resultando em duas amostras com 6 mm de comprimento; E - Duas amostras das proximais do mesmo dente e aplainamento das faces internas (parede pulpar); F - Aspecto final das amostras com aproximadamente 6 mm x 5 mm

Os dentes foram manuseados com luva de procedimentos pela coroa e posicionados numa máquina de corte¹. Os cortes foram realizados com um disco de diamante² posicionado perpendicular ao ápice da raiz do dente, em movimento longitudinal de palatino ou lingual para vestibular, de forma a manter intactas as superfícies proximais dos mesmos.

Para obter uma amostra com 6 mm de comprimento (Figura 4.3) foram feitas duas secções perpendiculares às superfícies radiculares: a primeira a 7 mm da JEC e a segunda, a 1 mm. Esse último corte originou dois fragmentos de cada face proximal de cada dente. Essas amostras foram presas com um porta-agulha e aplainadas numa politriz³ com a face proximal tratada voltada para cima. Foram obtidos fragmentos com uma largura de aproximadamente 5 mm e um comprimento de 6 mm. A medição de cada um dos fragmentos foi feita sobre um papel milimetrado plastificado.

Durante todos os tempos operatórios, as superfícies radiculares foram mantidas em PBS. Todos os fragmentos foram novamente autoclavados antes de serem irradiados ou submetidos aos testes de adesão e de proliferação celular.

¹ EXTEC Labcut 1010, EXCEL Technologies Inc., Connecticut, USA

² EXTEC Diamond Wafering Blade, XL 12205, EXCEL Technologies Inc., Connecticut, USA

³ Ecomet 3 Grinder/Polisher, Buheler Ltda., Illinois, EUA

- **Grupos experimentais**

Grupo Controle – só foi realizada a raspagem citada no início do preparo das amostras.

Grupo CW (Grupo Laser 1,5 W contínuo) – após os procedimentos realizados como os do grupo controle (RAR), utilizou-se o laser de diodo com 1,5 W de potência, $597,1 \text{ W/cm}^2$ na saída da fibra, emitindo em modo contínuo de operação com a fibra óptica de 400 μm , em contato e paralela às superfícies radiculares das amostras. Os fragmentos foram fixos com o auxílio de uma pinça possibilitando a irradiação sobre toda a área. As duas irradiações realizadas duraram 15 segundos cada, mantendo a superfície hidratada com solução de soro fisiológico, numa tentativa de simular uma atuação *in vivo*, no interior do sulco gengival ou da bolsa periodontal.

Grupo INT (Grupo Laser 1,5 W e 10 Hz - interrompido) – as amostras receberam o mesmo tratamento que o grupo B, exceto pela emissão do laser que foi feita no modo interrompido de operação em 10 Hz (50 ms).

Antes de iniciar o cultivo de células sobre as superfícies tratadas, uma amostra de cada grupo (n=3) foi separada para observação morfológica das superfícies obtidas através de MEV. Eletromicrografias com aumentos originais de 200 X e 1000 X foram obtidas para a observação morfológica.

- **Fase C: Biocompatibilidade - Estudo da adesão e proliferação de fibroblastos**

As células da linhagem celular LMF estabelecida a partir de um fragmento de gengiva humana (ALMEIDA-LOPES et al., 2001) foram cultivadas em meio de

cultura de Eagle modificado por Dulbecco⁴ contendo 10 % de soro fetal bovino⁵ e 1 % de solução antibiótica-antimicótica⁶. A cultura foi incubada em ambiente úmido, à 37° C, numa atmosfera contendo 95 % de ar e 5 % de dióxido de carbono. A monitorização do crescimento celular foi realizada a cada 24 horas, utilizando-se o microscópio invertido de fase. Os subcultivos foram feitos quando as células atingiram a subconfluência. O meio do frasco de cultivo foi aspirado, e a monocamada celular lavada duas vezes com solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA), pH 7,2. A seguir, as células foram separadas com 2 mL de uma solução de tripsina 0,25 %⁷. Após 2 minutos à 37 °C, a tripsina foi inativada com 5 mL de meio de cultura contendo soro fetal bovino. As células em suspensão foram transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas à 300 g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuspendido em 1 mL de meio fresco, e as células em suspensão foram então replaqueadas em novos frascos de cultivo. Para a manutenção da viabilidade das células, a troca dos meios de cultivo dos frascos foi feita a cada dois ou três dias.

A adesão e a proliferação celular foram examinadas através de culturas de células sobre as superfícies. Foram plaqueadas as mesmas quantidades de células sobre todos os fragmentos (27 no total, 9 em cada grupo experimental) de todos os grupos.

A quantidade de células por fragmento foi padronizada no número de 1×10^3 células por fragmento. Para a obtenção dessa contagem (10^3 células), foram utilizadas as células que cresceram nos frascos e que foram separadas através de

⁴ DME, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA

⁵ Cultilab, Campinas, SP, Brasil

⁶ Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA

⁷ Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA

tripsinização. Após a obtenção da suspensão, as células foram centrifugadas por 5 minutos (300 g), sendo o precipitado de células ressuspenso em 1 mL de PBSA. Parte desta suspensão de células (0,1 mL) foi transferida para um novo tubo de ensaio, onde foram adicionados 0,8 mL de PBSA e 0,1 mL de azul de Trypan. Ambas as câmaras de um hemocítômetro receberam a nova suspensão de células, que foram contadas sob microscópio de luz. O número total de células originárias do frasco foi obtido através da seguinte equação matemática:

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

Somente as células mortas apareceram coradas em azul, pela penetração do azul de Trypan, devido a lesões na membrana celular. A exclusão destas células da contagem geral serviu para a determinação da viabilidade celular. O número total de células viáveis foi obtido através da mesma sentença matemática, excluindo-se as células mortas, a saber:

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

Após a obtenção do número de células viáveis através de diluições, foram plaqueadas 10^3 células sobre cada fragmento dentário (FRESHNEY, 2000).

- **Microscopia eletrônica de varredura**

Todas as amostras, com ou sem células, foram identificadas e fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5 % em solução tampão de fosfato à 0.1 M (pH 7.4) por 2 horas à temperatura ambiente. A pós-fixação foi obtida através de solução de tetróxido de ósmio a 1 % no mesmo tampão. Em seguida, as amostras foram desidratadas em etanol em série crescente, imersas em HMDS (hexadimetil disilazona) por 20 minutos e secas no ar dentro de capela. As amostras foram submetidas ao processo de *sputtering*, sendo cobertas com uma camada de ouro de 10 nm. A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em duas etapas e em dois centros distintos, em microscópio eletrônico de varredura Leo 430⁸ (Fase B), e Philips XL– Edax com 20 kV⁹ (Fase C).

- **Contagem de células nas eletromicrografias**

Todos os fragmentos da Fase C, que receberam células sobre sua superfície, foram avaliados em microscópio eletrônico de varredura com distância focal fixa de 20 mm e aumentos de 15 X (possibilitando uma visão de toda a superfície do espécime) e 500 X para a contagem. Foram obtidas eletromicrografias de cinco áreas de cada fragmento localizadas no centro, campo superior direito, campo inferior direito, campo inferior esquerdo e campo superior esquerdo com o objetivo de homogeneizar as áreas de todos eles.

Sobre as eletromicrografias foi sobreposta uma folha de acetato que possibilitou a marcação com caneta para retroprojeter, para orientar a contagem das células aderidas sobre as superfícies das amostras.

⁸ Leo Ltd, Cambridge, UK. FOU SP, Depto. de Patologia Bucal.

⁹ Philips XL Série 30. IPEN, CCTM.

- **Adesão celular**

Para a análise da adesão celular foram utilizados os dados obtidos das contagens de células aderidas aos fragmentos dos três grupos experimentais, em triplicata, um dia após o plaqueamento.

- **Proliferação celular**

A proliferação celular foi analisada através das contagens do número de células aderidas aos fragmentos, nos diferentes tempos experimentais (um, dois e três dias) de todos os grupos, em triplicata. Estes dados foram utilizados para a obtenção das curvas de crescimento celular dos diferentes grupos experimentais.

- **Análise estatística**

Os dados de alteração de temperatura foram comparados utilizando o teste t de Student. Os dados dos números de células aderidas aos fragmentos dentários nos diferentes grupos e tempos experimentais foram comparados pelo teste ANOVA complementado pelo teste de Tukey. Para ambas análises estatísticas, o nível de significância adotado foi de 5 % ($p = 0,05$).

5 RESULTADOS

A monitoração de temperatura demonstrou que, com o parâmetro de 1,5 W (597,1 W/cm²), tanto no modo contínuo como no modo interrompido existe um aumento de temperatura (Figura 5.1). Esse aumento foi significativamente maior no grupo irradiado no modo contínuo do que no modo interrompido (Tabela 5.1). A variação média de temperatura foi de 5 °C +/- 0,5 para o grupo irradiado no modo contínuo, e 1,6 °C +/- 0.9 para o grupo irradiado no modo interrompido. Os gráficos de variação de temperatura individuais de cada dente em cada modo de irradiação estão apresentados no apêndice A. Foi verificado que, em função da anatomia do dente, algumas vezes a variação de temperatura no grupo irradiado no modo contínuo passou de 5,5 °C.

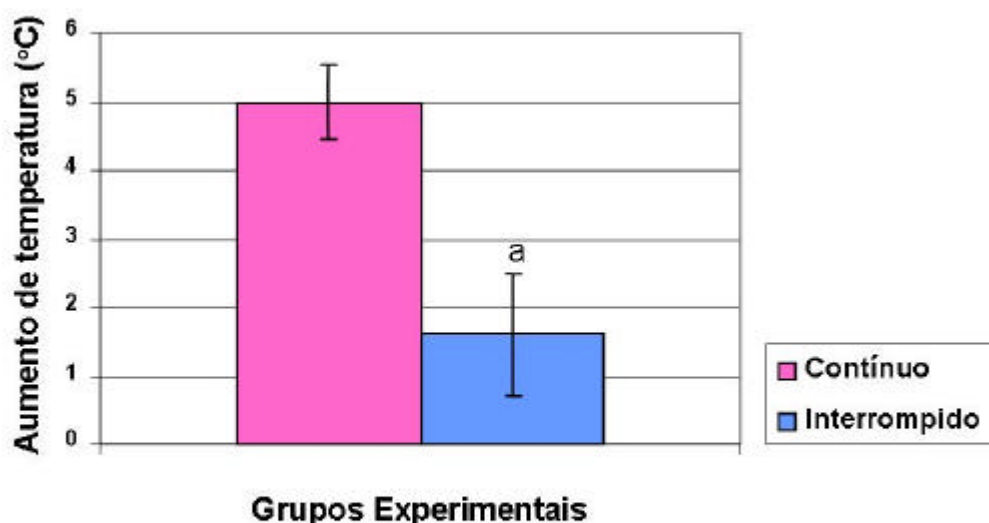


Figura 5.1- Representação Gráfica do aumento de temperatura em °C durante as irradiações nos modos contínuo e interrompido. (a) significativamente diferente do grupo contínuo ($p < 0,05$)

Tabela 5.1 - Comparação das diferenças entre as médias dos valores correspondentes ao aumento de temperatura (°C) segundo o teste t de Student

	Grupo Contínuo (CW)	Grupo Interrompido (INT)
Amostras	6	6
Média (°C)	5,0000	1,6000
Desvio padrão	1,3416	0,9077
Erro padrão	0,5477	0,3706
Desv. padrão da diferença	1,0315	---
Erro padrão da diferença	0,4211	---
Média das diferenças	3,4000	---
(t)=	8,0739	---
Graus de liberdade	5	---
(p) unilateral =	0,0000	---
(p) bilateral =	0,0000	---
IC (95%)	2,3173 a 4,4827	---
IC (99%)	1,7021 a 5,0979	---

A morfologia das superfícies radiculares periodontalmente comprometidas e previamente submetidas à raspagem e polimento coronário radicular após irradiação com laser de diodo estão representadas na Figura 5.2. Quando a irradiação se deu no modo interrompido, foi possível observar que a *smear-layer* apresentou-se modificado, exibindo uma superfície com presença de áreas de aspecto mais liso, entremeadas por zonas de aspecto mais corrugado, que em visão panorâmica

assemelhavam-se a sulcos (Figura 5.2 A). Observando essas áreas em detalhe (Figura 5.2 B), observou-se que nas áreas mais lisas houve fusão e ressolidificação com aspecto mais homogêneo, e nas áreas mais rugosas esses processos ocorreram de forma mais irregular. Túbulos dentinários abertos não foram observados.

Quando as superfícies radiculares foram irradiadas com o laser de diodo no modo contínuo (Figuras 5.2 C e D), as superfícies apresentaram morfologia similar à das superfícies irradiadas no modo interrompido. Foi observada presença de *smear-layer* que sofreu fusão e ressolidificação cobrindo totalmente os túbulos dentinários (Figura 5.2 D).

Os fibroblastos plaqueados sobre superfícies irradiadas (Figuras 5.3, 5.4, 5.5), aderiram e aumentaram em número no decorrer do tempo experimental de três dias. Morfologicamente essas células mostraram aspectos estrelários ou fusiformes e se espalharam sobre as superfícies tanto irradiadas no modo interrompido (Figuras 5.3 A - C), quanto no modo contínuo (Figuras 5.3 D - F). O número de células plaqueadas sobre essas superfícies mostrou crescimento significativo do primeiro ao último dia do tempo experimental (Figura 5.4). Adicionalmente, as curvas de crescimento das culturas plaqueadas sobre as duas superfícies irradiadas pelos dois modos apresentaram comportamento biológico similar, sendo que o número de células sobre cada superfície no mesmo tempo experimental foi semelhante.

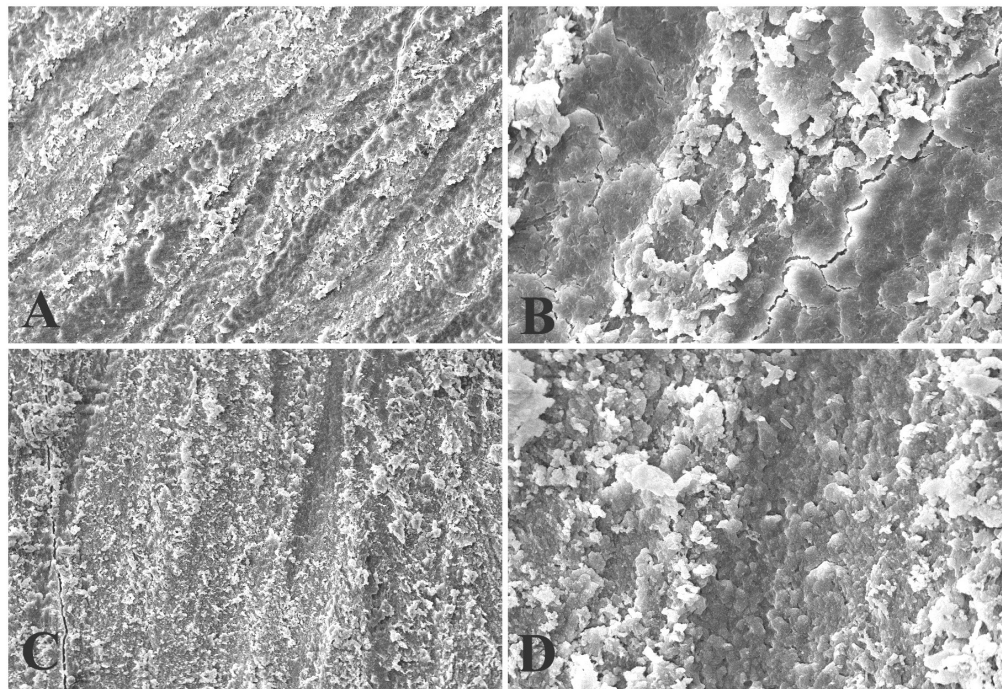


Figura 5.2 - Eletromicrografias de varredura de superfícies cimentárias irradiadas com o laser de Diodo nos modos interrompido (A e B) e contínuo (C e D)

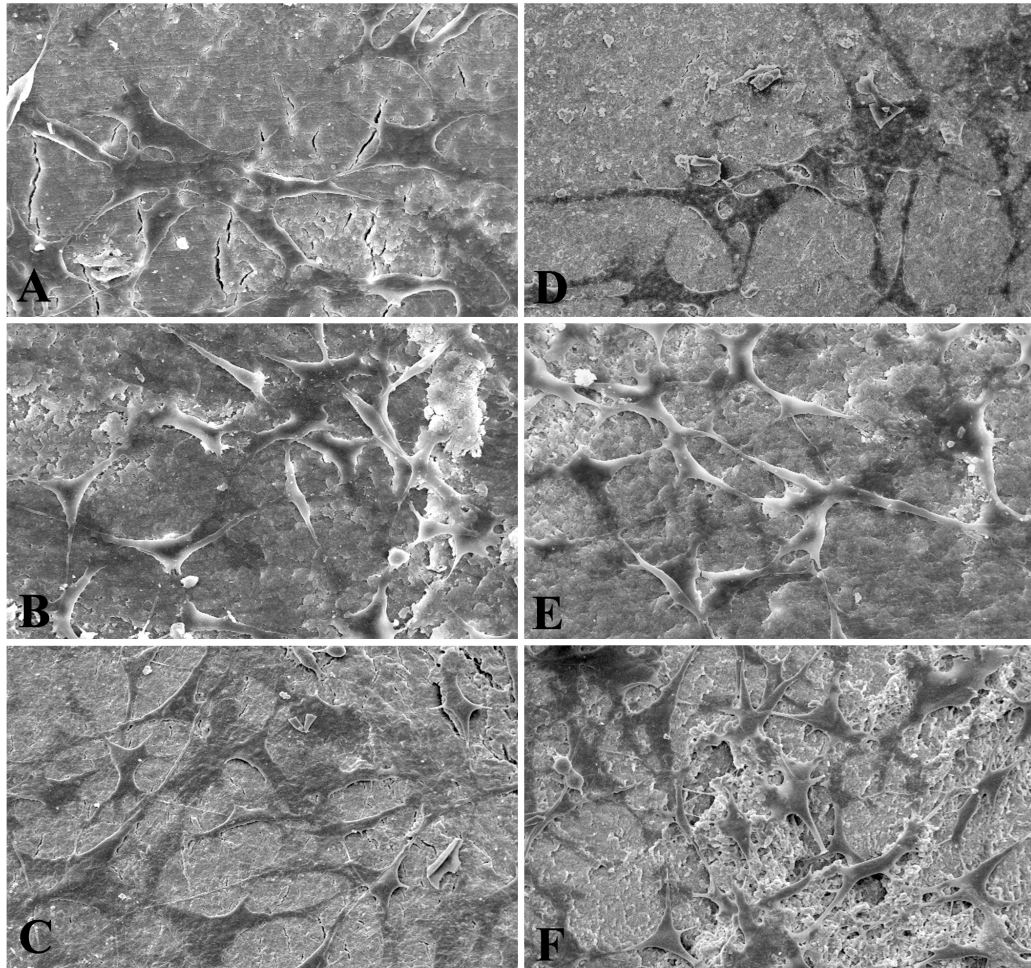


Figura 5.3 - Eletromicrografias de varredura das superfícies cementária irradiadas com o laser de Diodo no modo interrompido (A - C), e contínuo (D - F). Sobre as superfícies observam-se os fibroblastos após um (A e D), dois (D e E) e três (C e F) dias após o seu plaqueamento

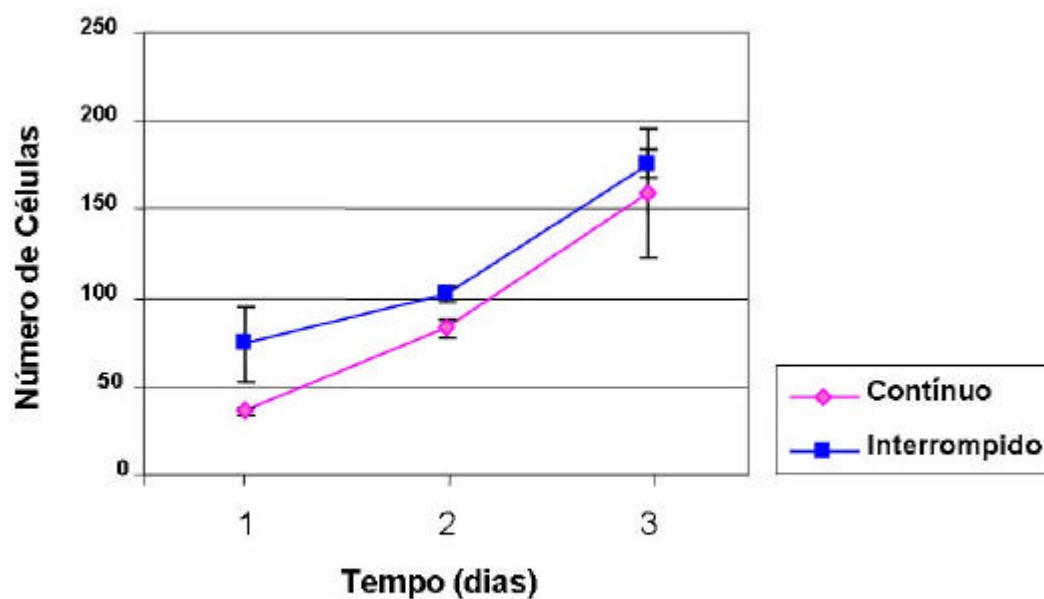


Figura 5.4 - Representação gráfica do número de células presentes nas superfícies radiculares irradiadas em função do tempo e desvio padrão

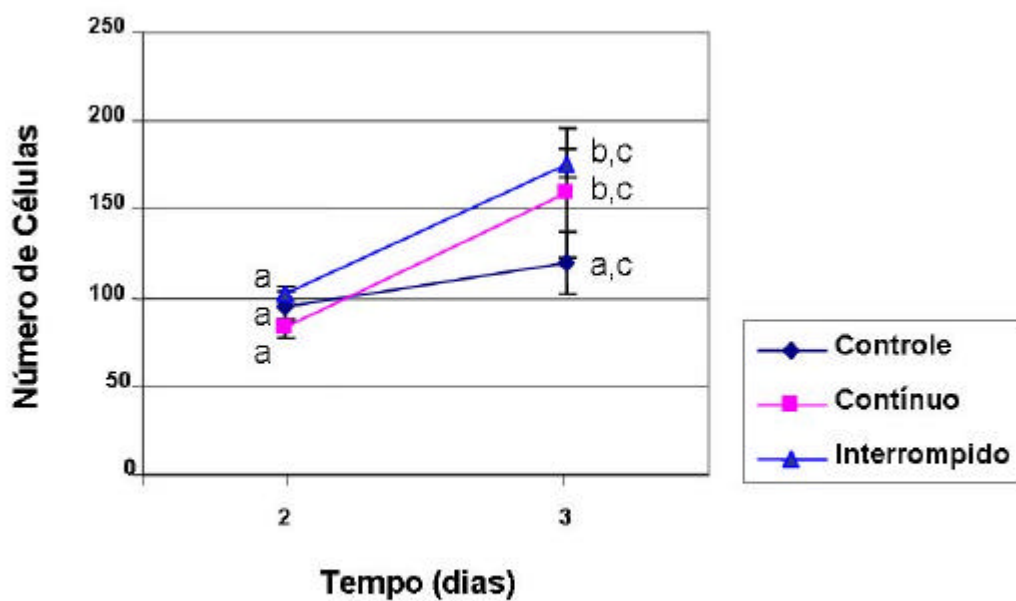


Figura 5.5 - Representação gráfica do número de células em função do tempo crescidas sobre superfícies radiculares não irradiadas (controle), e irradiadas nos modos contínuo e interrompido. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

Como a distribuição do número de células sobre as superfícies radiculares nos diversos grupos foi normal, os dados foram comparados pelo método multifatorial ANOVA, que mostrou não haver diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes tratamentos (irradiações modo contínuo e modo interrompido). Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes tempos experimentais (1, 2 e 3 dias) dentro dos mesmos grupos experimentais. A interação entre os tratamentos e os blocos (períodos experimentais) não mostrou diferenças estatisticamente significantes (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Comparação das diferenças entre as médias dos valores correspondentes ao número de células aderidas aos fragmentos de raízes dentárias dos diferentes grupos experimentais pelo teste ANOVA complementado pelo teste de Tukey

Fontes de variação	GL	SQ	QM
Tratamentos	1	2713,3889	2713,3889
Blocos	2	39400,1111	19700,0556
Interação	2	413,4444	206,7222
Erro	12	11558,0000	963,1667
F (tratamentos) =	2,8172	===	===
Graus de liberdade =	1,12	---	---
P (tratamentos)	0,1162	---	---
F (blocos) =	20,4534	---	---
Graus de liberdade =	2,12	---	---
P (blocos)	0,0003	---	---

Continua

Fontes de variação	GL	SQ	QM
F (interação) =	0,2146	---	---
Graus de liberdade =	2,12	---	---
P (interação) =	0,8113	---	---
Tukey	Grupos	Tempos	P
	CW	1 x 2	Ns
	CW	1 x 3	s < 0,01
	CW	2 x 3	Ns
	INT	1 x 2	Ns
	INT	1 x 3	s < 0,05
	INT	2 x 3	Ns

Conclusão

GL: Grau de Liberdade; **SQ:** Soma dos Quadrados; **QM:** Quadrados Médios

Quando o número de células aderidas sobre as superfícies irradiadas dois e três dias após o seu plaqueamento foi comparado com o número de células presentes sobre superfícies não irradiadas (controle), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (Figura 5.5). Adicionalmente, foi observado que células sobre as superfícies de controle não mostraram crescimento significativo no período experimental de três dias, apresentando número de células similar dois e três dias após o plaqueamento (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Comparação das diferenças entre as médias dos valores correspondentes ao número de células aderidas aos fragmentos de raízes dentárias dos grupos experimentais e controle pelo teste ANOVA complementado pelo teste de Tukey

Fontes de variação	GL	SQ	QM
Tratamentos	2	2934,3333	1476,1667
Blocos	1	15312,5000	15312,5000
Interação	2	2557,0000	1278,5000
Erro	12	11314,6667	942,8889
F (tratamentos) =	1,5560	===	===
Graus de liberdade =	2,12	---	---
p (tratamentos)	0,2501	---	---
F (blocos) =	16,2400	---	---
Graus de liberdade =	1,12	---	---
p (blocos)	0,0020	---	---
F (interação) =	1,3559	---	---
Graus de liberdade =	2,12	---	---
p (interação) =	0,2945	---	---
Tukey	Grupos	Tempos	P
	Controle	1 x 2	ns
	CW	1 x 2	s < 0,05
	INT	1 x 2	s < 0,05

GL: Grau de Liberdade; **SQ:** Soma dos Quadrados; **QM:** Quadrados Médios

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a utilização do laser de diodo de alta potência sobre a superfície radicular de dentes humanos. A fase A do trabalho objetivou a segurança na variação de temperatura através da sua monitoração com o uso de termopar no interior da câmara pulpar. Na fase B os espécimes foram irradiados de acordo com os parâmetros de cada grupo e a morfologia das superfícies, após as irradiações com o laser, foi observada em MEV. Finalmente na fase C a biocompatibilidade da superfície foi analisada através do cultivo celular sobre a superfície radicular e contagem dos fibroblastos de gengiva humana após a irradiação com o laser, aferindo-se a adesão e a proliferação. O objetivo deste trabalho foi padronizar parâmetros seguros para a utilização clínica do laser de diodo e analisar a resposta celular perante esta indicação. Uma vez alcançado os resultados, o próximo passo será certificar o uso diário do instrumento na clínica odontológica.

A monitoração de temperatura demonstrou que houve aumento de temperatura dentro dos limites seguros e que esse aumento foi significativamente maior no grupo irradiado no modo contínuo do que no grupo irradiado no modo interrompido. Nos espécimes dos grupos irradiados com o laser de diodo, observou-se presença de *smear-layer* modificada, exibindo uma superfície com áreas de aspecto mais liso correspondendo às áreas de fusão e ressolidificação, entremeadas por zonas de aspecto mais corrugado. Túbulos dentinários abertos não foram observados. Os fibroblastos plaqueados sobre as superfícies irradiadas aderiram e aumentaram em número no decorrer do tempo experimental. As curvas de

crescimento celular sobre as superfícies irradiadas com os dois modos de emissão do laser, apresentaram comportamento biológico similar entre si e com o grupo controle.

Os lasers de alta potência podem causar elevação de temperatura sobre os tecidos alvos durante a irradiação. Há a necessidade de padronização de parâmetros corretos na utilização clínica dos diversos lasers em Odontologia. O laser de diodo de alta potência de comprimento de onda de 808 nm não é bem absorvido na superfície radicular, por esta não apresentar nenhum cromóforo absorvedor para o seu comprimento de onda (MALDONADO; RIBEIRO; ZECELL, 2000). Isso o torna favorável ao uso em tecidos moles do interior e profundidade do sulco e bolsas periodontais, sendo absorvido pelos tecidos pigmentados (hemoglobina, por exemplo, é um cromóforo absorvedor do comprimento de onda do laser de diodo utilizado no estudo), sem causar danos na superfície radicular (AOKI et al., 2000). Porém, deve-se ressaltar que, por não ser absorvida na superfície radicular, a radiação do laser de diodo depositada promoverá um efeito térmico superficial e em profundidade. Por esta razão, há a possibilidade de haver dano no tecido pulpar adjacente, o que torna a monitoração da temperatura durante a irradiação imprescindível.

Na literatura, alguns trabalhos iniciais com o uso do mesmo comprimento de onda em periodontia apresentaram parâmetros variando em torno de 1,5W (THEODORO et al., 2003; GULIN, 2003; MACRI 2001), que baseou o início do experimento. Porém, apesar dos trabalhos pré-existentes, optou-se por confirmar a segurança dos parâmetros que seriam utilizados. Os resultados obtidos na fase A do presente estudo, vieram de encontro com os limites alcançados pelos supracitados autores.

A fase inicial do projeto foi responsável pelo cuidado com os possíveis danos térmicos decorrentes da utilização do laser de diodo irradiando a superfície radicular. O resultado da monitoração de temperatura foi significativamente maior no grupo irradiado no modo contínuo do que no grupo irradiado no modo interrompido. A variação média de temperatura foi de $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ para o grupo irradiado no modo contínuo, e $1,6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,9$ para o grupo irradiado no modo interrompido. Os autores Zach e Cohen (1965), estabeleceram o parâmetro de $5,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ de variação como limite seguro sem causar danos térmicos no tecido pulpar em dentes de macaco. Algumas vezes a variação de temperatura no grupo irradiado no modo contínuo passou de $5,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, quando realizada em incisivo central inferior. No entanto mesmo com esse aumento, o uso foi seguro já que Baldissara, Catapano e Scotti (1997) concluíram que parâmetros de $11,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ não causam injúrias sobre o tecido pulpar, uma vez que não foram detectados nas amostras sinais de inflamação e processos de reparação. Pode-se concluir que os parâmetros estabelecidos no presente estudo asseguram a utilização clínica, independente da anatomia dos dentes.

Nossos resultados foram coerentes com os valores presentes nos trabalhos de Gullin (2003) que obteve médias de $7,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando laser de diodo de alta potência em contato com um ângulo de 5° com a superfície radicular, fato esse que pode ter elevado a média de temperatura. Theodoro et al. (2003) que compararam a utilização do laser de Er:YAG e de diodo de alta potência (810 nm, parâmetros de 1,0 W e de 1,4 W interrompido durante 30 s) sobre superfícies radiculares de dentes humanos obteve variações de temperatura para o laser de diodo com taxa de $1,6 \pm 0,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ no parâmetro de 1,0 W e no parâmetro de 1,4 W a taxa foi de $3,3 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. A irradiação foi feita com a fibra em contato com a superfície, o que explica a elevação da variação de temperatura, se comparada com os nossos resultados onde a fibra

foi posicionada paralela à superfície. E, finalmente, Macri (2001) que monitorou a variação da temperatura na câmara pulpar durante a irradiação com laser de diodo de alta potência de 830 nm sobre o esmalte dental de dentes incisivos bovinos, com parâmetros de 1 e 2 W, durante 10 segundos de irradiação em modo contínuo, utilizando tinta preta como fotoabsorvedor. O autor concluiu que o parâmetro de 1 W foi seguro em sua utilização. O fato de o autor ter utilizado o fotoiniciador, resultou em absorção do comprimento de onda na superfície radicular, aumentando também os valores de temperatura obtidos. Resultado que é comparável ao obtido por Kreisler et al. (2002) que concluíram que o parâmetro seguro de utilização do laser de diodo de 809 nm emitindo em modo contínuo é de 1 W durante 10 a 30 segundos de irradiação, sendo os parâmetros de 1,5, 2,0 e 2,5 W destrutivos ou de efeitos negativos para a superfície radicular. Deve-se ressaltar que o autor umedeceu as superfícies com película de sangue humano, que também por sua vez possui o cromóforo absorvedor para o comprimento de onda do laser utilizado, aumentando então a absorção superficial.

A absorção superficial ou não do laser de diodo de alta potência sobre a superfície radicular também vai determinar o aspecto morfológico da interação laser e tecido biológico. Sendo assim, ao longo da análise de temperatura citada anteriormente, já é possível observar conclusões dos diversos autores sobre os resultados obtidos. Aoki et al. (2000) que descrevem o laser de diodo como instrumento coadjuvante favorável ao tratamento periodontal no interior de sulcos e bolsas periodontais pelo fato de não ser absorvido pela superfície radicular, que não apresenta os cromóforos necessários para que isso ocorra com o comprimento de onda de 808 nm, cita uma superfície sem alterações após a irradiação, favorecendo a adesão celular.

Theodoro et al. (2003) concluíram que as eletromicrografias demonstraram não haver mudanças morfológicas superficiais, como fusão ou derretimento cementário significantes, em qualquer um dos grupos irradiados com laser de diodo de 810 nm. Entretanto, no grupo do uso do laser de Er:YAG, as superfícies demonstraram-se mais irregulares, mais pronunciadas em comparação com laser de diodo. Kreisler et al. (2002) observaram que as amostras irradiadas com a superfície seca ou umedecidas com solução salina não sofreram alterações em nenhum dos parâmetros utilizados (1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 W em modo contínuo durante 10 a 30 s). Por outro lado, as amostras cobertas por película de sangue humano apresentaram severas alterações, dependendo do parâmetro utilizado. Foram encontradas áreas de carbonização total ou parcial. Nos resultados obtidos pelo autor fica constatada a interação da luz laser com o tecido biológico com a presença ou não de cromóforo absorvedor. Theodoro (2003) também concluíram que o uso do laser de diodo sobre superfícies radiculares causa alterações morfológicas superficiais inibindo a adesão (THEODORO et al., 2005).

Gulin (2003) encontrou resultados bastante semelhantes com os obtidos no presente estudo. As eletromicrografias apresentaram pouca presença de *smear layer*, com aspecto de maior lisura e homogeneidade da superfície radicular, sendo que nos parâmetros com maior potência observou-se ranhuras evidentes intercaladas com áreas lisas homogêneas. No nosso estudo foi utilizada a própria solução de PBS, onde os espécimes estavam armazenados para umedecer as superfícies durante a irradiação. A avaliação morfológica através da observação de eletromicrografias de varredura resultou em achados condscendentes com os encontrados na literatura. O fato de existirem zonas não homogêneas nos achados

em MEV nos leva a pensar na necessidade de novos estudos idealizando modos de irradiação do laser sobre a superfície visando tornar esse aspecto mais uniforme.

O aspecto da biocompatibilidade superficial das áreas irradiadas com laser também segue o mesmo raciocínio da absorção do laser e interação com o tecido alvo, podendo gerar efeitos térmicos e alterações morfológicas, que por sua vez podem interferir na adesão celular sobre a área estudada. Dessa maneira, estudos que apresentaram alterações superficiais prejudiciais à superfície sugeriram condições inadequadas à adesão e crescimento celular (KREISLER et al., 2002). No presente estudo a observação em eletromicrografias de varredura demonstrou que os fibroblastos plaqueados sobre as superfícies irradiadas aderiram e aumentaram em número no decorrer do tempo experimental. Pode-se concluir, nas condições deste estudo, que o uso do laser de diodo de alta potência é seguro do ponto de vista térmico, e causa alterações morfológicas superficiais similares, independentemente dos modos de irradiação, sem causar danos deletérios ou muito prejudiciais à superfície, de modo a impedir a adesão e o crescimento celular. Essas superfícies radiculares irradiadas tornam-se então biocompatíveis à adesão e à proliferação celular. Fato que pode ser interpretado como favorável nos estudos de Theodoro et al. (2003, 2005), Theodoro (2003) e Gulin (2003) que observaram superfícies sem aspectos morfológicos desfavoráveis, necessitando de mais estudos na área que complementassem esses resultados.

Além dos resultados térmicos seguros, morfológicos favoráveis resultando em superfície biocompatível, de acordo com os resultados do presente estudo, o laser mostrou eficiência na ação de redução microbiana nos achados literários. Este é um outro fator importante para o uso do laser de diodo de alta potência na dinâmica da

terapia periodontal clínica (MORITZ et al., 1997a, 1997b, 1997c, 1999; RADAELLI, 2002; KERISLER et al., 2003).

Na periodontia o uso do laser requer mais abrangência nas pesquisas, com o objetivo de assegurar seu uso, complementando-se, agora, com estudos na área de redução microbiana. Alguns trabalhos já encontraram eficiência na clínica periodontal diária, com redução evidente de bolsas periodontais (MORITZ et al., 1997a, 1997b, 1997c, 1998).

O estudo *in vitro* não pode suportar resultados *in vivo* porque as situações são diferentes. No paciente a presença de sangue na bolsa ou sulco periodontal pode alterar os resultados aqui observados, uma vez que a absorção na superfície da raiz seria maior e eventualmente poderia causar danos como mostrados por Kreisler et al. (2002) e Theodoro et al. (2003, 2005). Por outro lado em situações clínicas cirúrgicas de retalho, expondo a superfície radicular, o laser poderia ser utilizado. Talvez esses parâmetros fossem os mais indicados nas condições mais semelhantes com a do nosso estudo. Portanto, novos estudos devem ser realizados antes da utilização clínica do laser de diodo de alta potência em periodontia.

7 CONCLUSÕES

Os parâmetros de irradiação do laser de diodo de alta potência utilizado (1,5 W, 597,1 W/cm²) é seguro do ponto de vista térmico. Além disso, essa irradiação altera a topografia da superfície radicular sem modificar a biocompatibilidade das mesmas.

REFERÊNCIAS¹

Absten GT, Joffe SN. Lasers in Medicine and Dentistry: an Introductory Guide. 3rd ed. Chapman & Hall Medical; 1963. cap.3 , p27-35.

Aleo JJ, De Renzis FA, Farber P. A. *In vitro* attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. J Periodontol 1975;46(11):639-45.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. Lasers Surg Med 2001;29(2):179-84.

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

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

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol 1999;4(1):1-6.

Azevedo LH. Avaliação dos efeitos do laser de diodo associado ou não ao flúor na superfície do esmalte dental: estudo *in vitro* ao microscópio eletrônico de varredura [Monografia Curso de Especialização em Odontopediatria]. São Paulo: Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Odontologia da Universidade de São Paulo; 2002.

Bader HI. Use of lasers in periodontics. Dent Clin North Am 2000;44(4):779-91 .

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Baldissara P, Catapano S, Scotti R. Clinical and histological evaluation of thermal injury thresholds in human teeth: a preliminary study. *J Oral Rehabil* 1997;24:791-801.

Borrajo JL, Varela LG, Castro GL, Rodriguez-Nunez I, Torreira MG. Diode laser (980 nm) as adjunct to scaling and root planing. *Photomed Laser Surg* 2004;22(6):509-12.

Cohen BI, Deutsch AS, Musikant BL. Effect of power setting on temperature change at the root surface when using a holmium:YAG laser in enlarging the root canal. *J Endod* 1996;22(11):596-9.

Cobb CM. Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Ann of Periodontol* 1996;1(1):443-90.

Crespi R, Romanos GE, Barone A, Sculean A, Covani U. Er:YAG laser in defocused mode for scaling of periodontally involved root surfaces: an in vitro pilot study. *J Periodontol* 2005;76(5):686-90.

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

Eduardo CP, Pelino JEP, Haypek P. The clinical use of lasers in Dentistry. In: Abstracts of the 1st Congress of the European Society for Oral Applications ESOLA; 2001 May 17-20;Vienna, Austria. Austria: ESOLA; 2001. p.3, Abs 7.

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

Feist IS. Adesão e Proliferação de Fibroblastos de Gengiva Humana Cultivados sobre Superfícies Radiculares Tratadas com Laser de Er:YAG [Tese Doutorado em Periodontia]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2002.

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

Freshney RI. Culture of animals cells – a manual of basic technique. 4th ed. New York: A John Wiley&Sons; 2000.

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

Gutknecht N, Franzen R, Meister J, Vanweersch L, Mir M. Temperature evolution on human teeth root surface after diode laser assisted endodontic treatment. *Lasers Med Sci.* 2005;20(2):99-103.

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

Haypek P. Redução bacteriana pós aplicação do laser de Dióxido de Carbono na superfície de implantes contaminados com *S. sanguis*. [Dissertação Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo 2001.

Kreisler M, Al Haj H, Daublander M, Gotz H, Duschner H, Willershausen B et al. Effect of DiodeLaser Irradiation on Root Surfaces *in vitro*. *J Clin Las Med Sur* 2002;20(2):63-9.

Kreisler M, Daublander M, Willershausen-Zonnchen B, D'hoedt B. Effect of diode laser irradiation on the survival rate of gingival fibroblast cell cultures. *Las Surg Med* 2001;28:445-50.

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

Macri RT. Avaliação da variação da temperatura na câmara pulpar após irradiação de diodo laser de alta potência de 830 nm em esmalte dental *in vitro*. [Dissertação Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/ Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2001.

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

Mc Nally K, Gillings B, Dawes J. Laser-dye ablation technique for removal of carious dentin and enamel. In: Proceedings of the Lasers in Dentistry III. Progress in Biomedical Optics; 1997 Feb. 8-9; San Jose, California. California: SPIE; 1997. v. 2973, p. 62-73.

Moritz A, Gutknecht N, Doertbudak O, Goharkhay K, Schoop U, Schauer P et al. Treatment of periodontal pockets with a diode laser. *Lase Sur Med* 1998;22:302-11.

Moritz A, Gutknecht N, Doertbudak O, Goharkhay K, Schoop U, Schauer P et al. Bacterial reduction in periodontal pockets through irradiation with a diode laser: a pilot study. *J Clin Las Med Sur* 1997a;15(1):37-7.

Moritz A, Gutknecht N, Goharkay K, Schoop U, Wernisch J, Sperr W. In vitro irradiation of infected root canals with diode laser: Results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. *Quintess Intern* 1997b;28:205-9.

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

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

Mouhyi J, Sennerby L, Reck JV. The soft tissue response to contaminated and cleaned titanium surfaces using CO₂ laser, citric acid and hydrogen peroxide. Clin Oral Impl Res 2000;11 (2):93-8.

Nubler-Moritz M, Gutknecht N, Sailer HF, Hering P, Prettl W. A laboratory investigation of the efficacy of Holmium: YAG laser irradiation in removing intracanal debris. In: Proceedings of the Lasers in Dentistry III. Progress in Biomedical Optics; 1997 feb. 8-9; San Jose, California. California: SPIE; 1997. v. 2973, p. 150-6.

Oliveira MV, Wetter NU, Zezell DM, Boari HGD, Marrachini TM, Eduardo CP. Morphological modifications in the enamel with dye-assisted diode laser (960 nm) irradiation. In: Proceedings of the 7th International Congress on Lasers in Dentistry; 2000 jul/aug; Belgica. Belgica: ISLD; 2000. p. 37.

Pitaru S, Melcher AH. Orientation of gingival fibroblasts and newly-synthesized fibers *in vitro*. J Periodontal Res 1983;18(5):483-500.

Purucker P, Romanos GE, Bernimoulin JP, Nentwig GH. In vitro study on the bactericidal effect of CO₂ laser irradiation on titanium implants that are contaminated with two periodontal pathogens. In: Proceedings of the 6th International Congress On Lasers In Dentistry; 1998 jul. 28-30; Maui, Hawaii. Maui: ISLD; 1998. p.15, Abs 29.

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

Quinto Jr J, Oliveira MV, Wetter NU, Rattichieri F, Zezell DM, Eduardo CP. Morphological and thermal analysis of resolidified dental enamel surface after DYE assisted irradiation with diode laser. In: Abstracts of the 1st Congress of the European Society for Oral Applications ESOLA; 2001 may. 17-20; Vienna, Austria. Austria: ESOLA; 2001. p.9, Abs 22.

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

Romanos GE. Laser applications in implantology. State-of-the-Art. In: Abstracts of the 1st Congress of the European Society for Oral Applications ESOLA; 2001 may. 17-20;Vienna, Austria. Austria: ESOLA; 2001. p.21, Abs 54.

Romanos GE , Henze M, Banihashemi S, Parsanejad HR, Winckler J, Nentwig GH. Removal of epithelium in periodontal pockets following diode (980 nm) laser application in the animal model: an in vitro study. Photomed Laser Surg 2004; 22(3):177-83.

Romanos GE , Karman MA, Nentwig GH. Clinical experience with a diode laser in oral surgical procedures. In: Proceedings of the 6th International Congress On Lasers In Dentistry; 1998 jul. 28-30; Maui, Hawaii. Maui: ISLD; 1998. p.38.

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

Schwarz F, Sculean A, Berakdar M, Szathmari L, Georg T, Becker J. In vivo and in vitro effects of an Er:YAG laser, a GaAlAs diode laser, and scaling and root planing on periodontally diseased root surfaces: a comparative histologic study. Lasers Surg Med 2003;32(5):359-66.

Terranova VP, Martin GR. Molecular factors determining gingival tissue interaction with tooth structure. J Periodontal Res 1982;17(5):530-3.

Theodoro LH. Estudo comparativo, através de microscopia eletrônica de varredura, da ação de diferentes meios químicos e do laser de Er:YAG, sobre a smear layer, em superfícies radiculares submetidas à raspagem e aplainamento [Tese Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares / Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2001

Theodoro LH. Ação do laser de Er:YAG e de diodo na adesão de elementos sangüíneos e na morfologia de superfícies radiculares irradiadas. Estudo através de microscopia eletrônica de varredura [Tese Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista; 2003.

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

Theodoro LH, Sampaio JEC, Haypek P, Bachmann L, Zezell DM. Effect of Er:YAG and diode lasers in the adhesion of blood components and in the morphology of irradiated root surfaces. J Periodontol Res. In press August 2005.

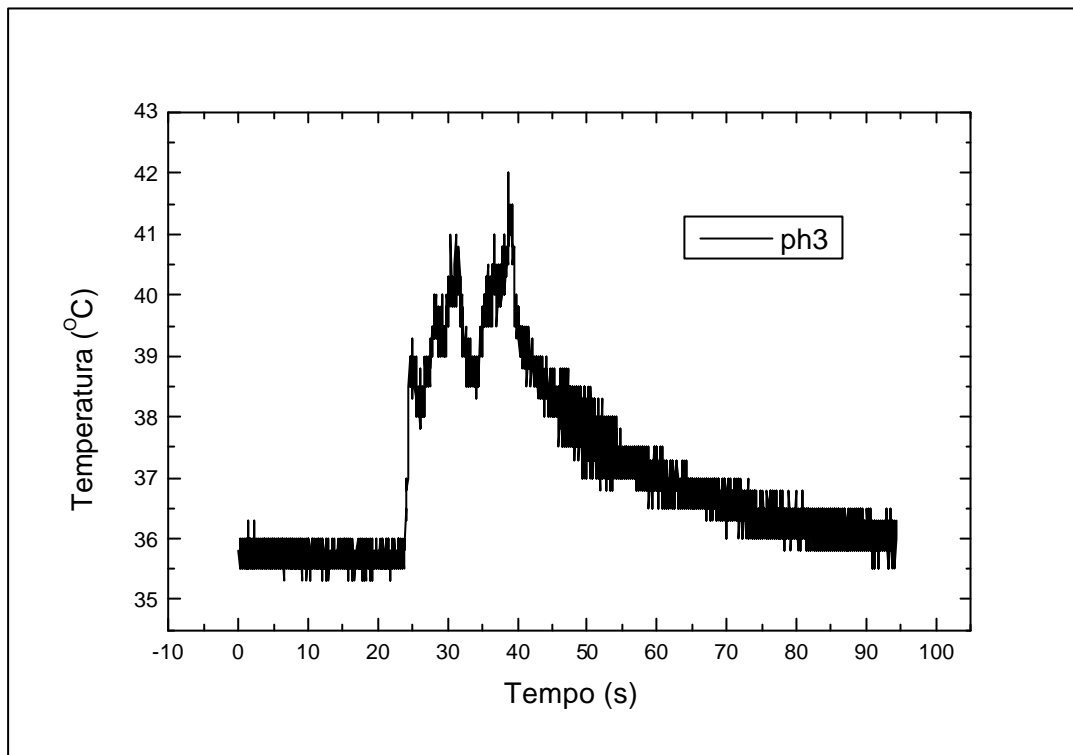
Todescan, J. H. Doença periodontal. Conceitos e classificações. São Paulo: Santos, 2001.

Trylovich DJ, Cobb CM, Pippin DJ, Spencer P, Killoy WJ. The effects of the Nd:YAG laser *in vitro* fibroblast attachment to endotoxin-treated root surfaces. J Periodontol 1992;63(7):626-32.

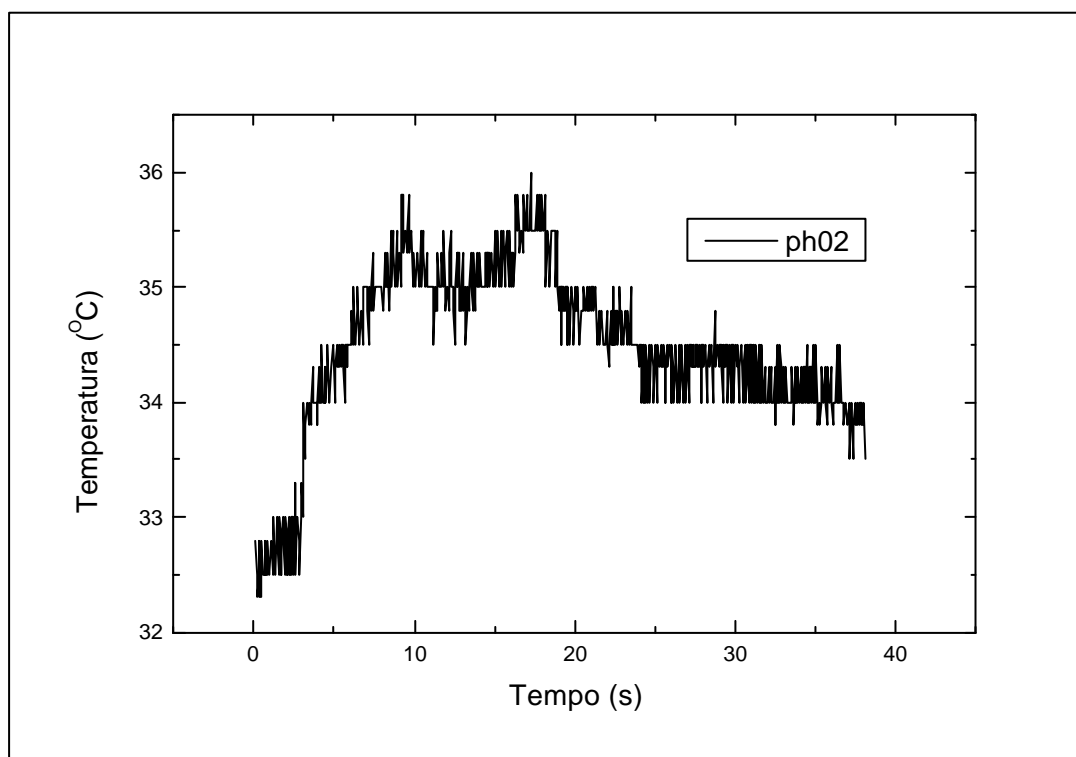
Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1965;19:515-30.

APÊNDICE A - Gráficos da monitoração da variação de temperatura

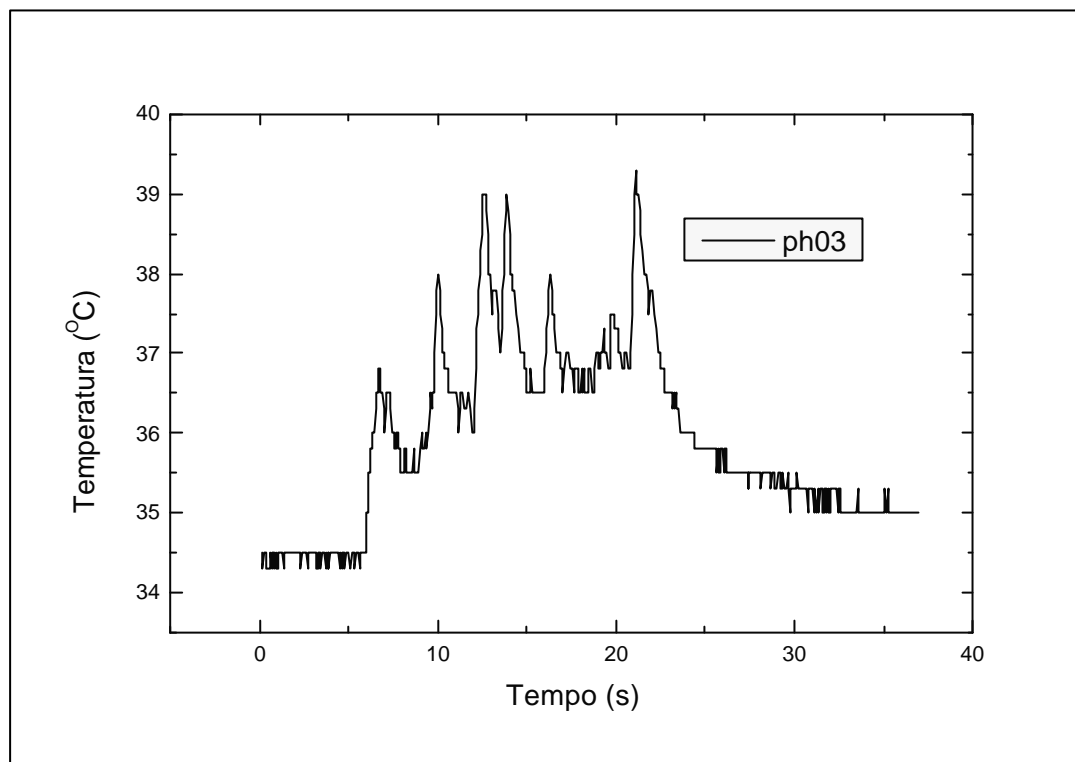
Incisivo inferior 1,5 W CW (Aumento de 6,5 °C)



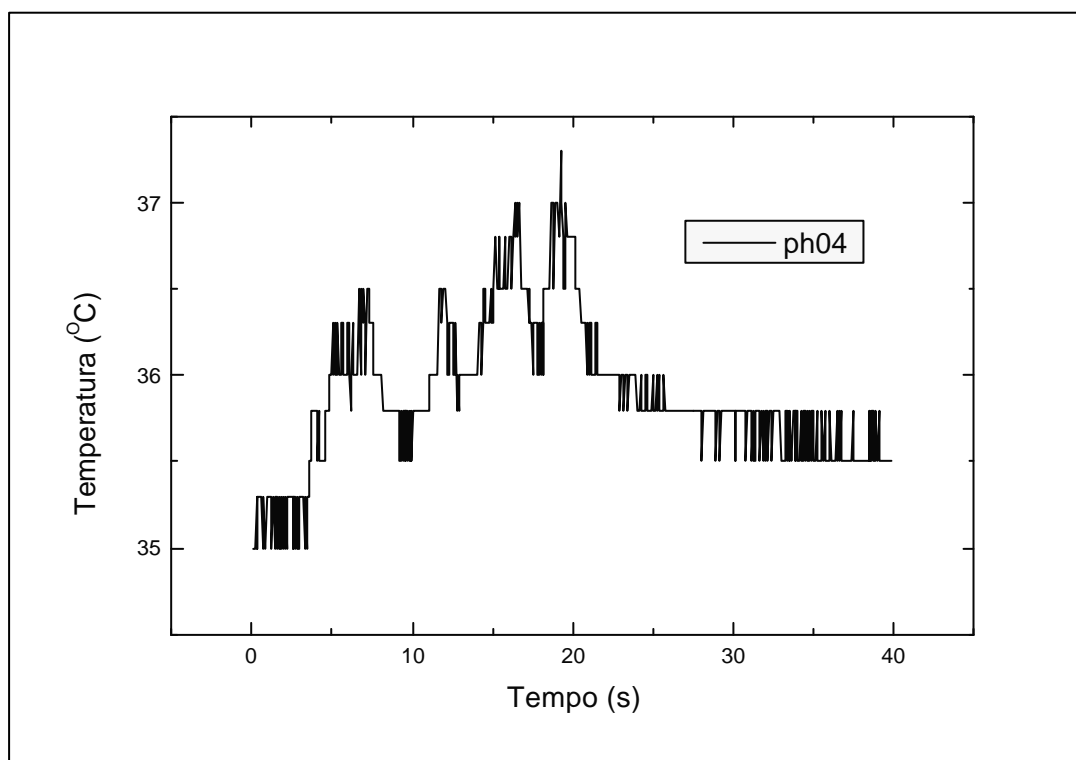
Canino 1,5 W CW (Aumento de 3,5 °C)



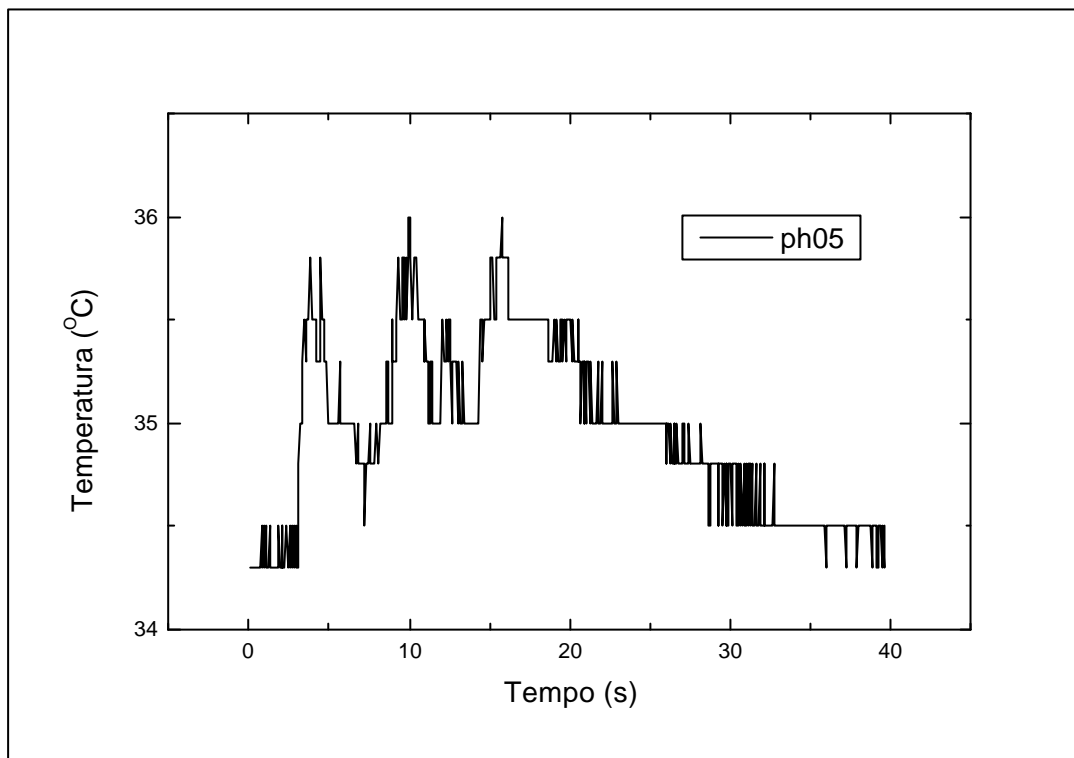
Incisivo central superior 1,5W CW (Aumento de 5 °C)



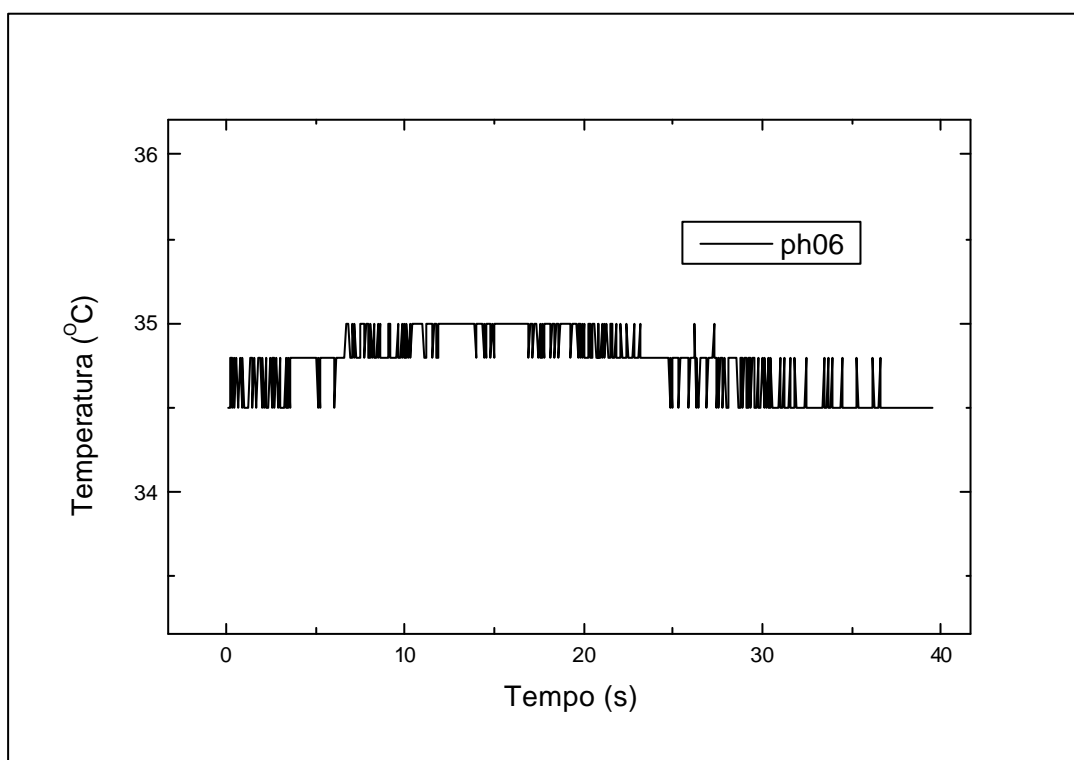
Incisivo central superior 1,5 W INT (Aumento de 2,5 °C)



Incisivo inferior 1,5 W INT (Aumento de 1,8 °C)



Canino 1,5 W INT (Aumento de 0,5 °C)





PARECER n° 73/03
Protocolo 67/03

O grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "*Estudo da interação do laser de diodo de alta potência sobre a superfície de cimento radicular. Análise morfológica, térmica e a adesão e proliferação de fibroblastos*" de responsabilidade da Pesquisadora **Patricia Haypek**, sob orientação do Professor Doutor **Carlos de Paula Eduardo**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios referentes ao andamento da pesquisa em 25 de outubro de 2003 e em 25 de abril de 2004. Ao término da pesquisa, cópia do trabalho em "cd" ou "disquete", deve ser encaminhada a este CEP.

São Paulo, 25 de abril de 2003

Profª Drª **ROSA HELENA MIRANDA GRANDE**
Coordenadora do CEP-FOUSP

ANEXO B – Carta de aprovação do banco de dentes permanentes humanos da FOU SP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia



São Paulo, 24 de março de 2003.

O Banco de Dentes Permanentes Humanos da FOU SP autoriza a pesquisadora Patrícia Haypek a retirar dentes recém-extraídos juntamente com os estagiários do BDPH durante as clínicas de cirurgia, para a realização da pesquisa "Estudo da interação do laser de diodo de alta potência sobre a superfície do cimento radicular. Análise térmica, análise de superfície em mev e adesão e proliferação de fibroblastos."

A pesquisadora é responsável pela elaboração do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a referida pesquisa.


Marília Vanzelli – Coordenadora Acadêmica do BDPH

ANEXO C - Carta de doação de dentes recém-extraídos da clínica de cirurgia da UNIFMU
(Faculdades Metropolitanas Unidas)

Eu, Prof. Dra. Maria da Graça Homem, como responsável da clínica de Cirurgia da UniFMU, cederei por esse ato à Doutoranda Patrícia Haypek, dentes recém-extraídos com finalidade terapêutica, devidamente justificada nos respectivos prontuários, para a utilização na pesquisa *“Estudo da interação do laser de diodo de alta potência sobre a superfície radicular. Análises morfológica, térmica e a adesão e proliferação de fibroblastos.”*