



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**“ADESÃO DE FIBROBLASTOS EM UMA SUPERFÍCIE
RADICULAR PREVIAMENTE IRRADIADA COM
LASER DE Nd: YAG”**

MARIA DAS GRAÇAS CRUZ NAJAR

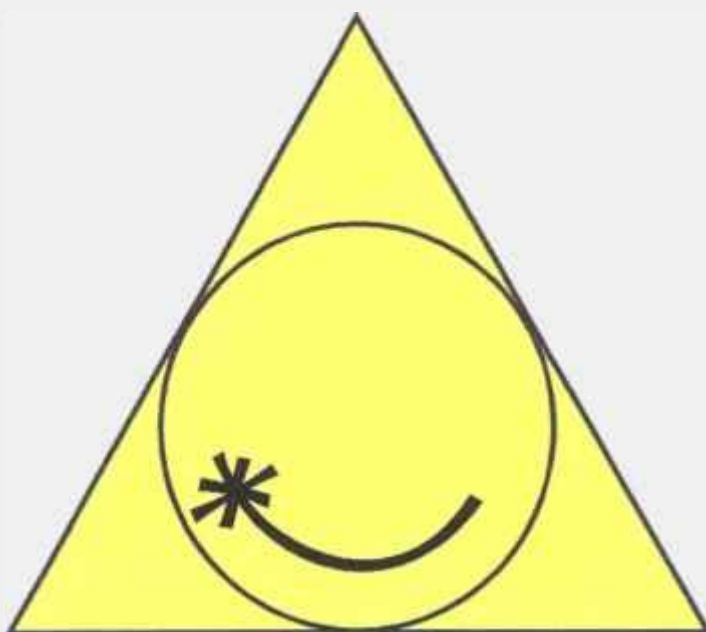
Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre Profissional na área de
Lasers em Odontologia.

Orientador:
Prof. Dr. Wagner De Rossi

Co-orientador:
Prof. Dr. José Eduardo Pelison Pelino

**São Paulo
2004**





**MESTRADO PROFISSIONALIZANTE DE LASER EM
ODONTOLOGIA**



Autarquia associada à Universidade de São Paulo

“Adesão de fibroblastos em uma superfície radicular previamente irradiada com LASER de Nd: YAG”

Maria das Graças Cruz Najar

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Mestre
Profissional na área de Laser em Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Wagner De Rossi

**Co-orientador: Prof. Dr. José Eduardo
Pelison Pelino**



FOUSP



**São Paulo
2004**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
IPEN**

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos filhos, **Henrique e Leandro**, pelo amor, carinho, incentivo e compreensão durante esta etapa.

Vocês são a maior razão da minha vida

Ao meu pai **Waldemar da Cruz**

A minha mãe **Maria Mercêdes Machado Cruz** (*in memoriam*)

A minha irmã **Vera Lúcia Cruz M. de Freitas**

Ao meu cunhado **Francisco Carlos Marques de Freitas**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO**

**“Adesão de fibroblastos em uma superfície
radicular previamente irradiada com
LASER de Nd: YAG”**

Maria das Graças Cruz Najar

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Mestre
Profissional na área de Laser em Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Wagner De Rossi
Co-orientador: Prof. Dr. José Eduardo
Pelison Pelino

São Paulo
2004

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador **Professor Wagner de Rossi**, pela paciência, desprendimento, competência e principalmente pelo respeito e disponibilidade durante toda realização deste trabalho, meu especial agradecimento e eterno reconhecimento.

A **Professora Márcia Martins Marques**, a quem agradeço de forma especial, sua ajuda foi fundamental para realização de toda parte laboratorial deste trabalho. Obrigada pelo desprendimento e boa vontade comigo.

Ao meu co-orientador **Professor José Eduardo Pellison Pelino**, pela sugestão do projeto.

Aos funcionários do **IPEN**.

Aos funcionários do **LELO**.

Aos funcionários da **FOUSP**, em especial ao Sr. **Aldo Francisco Gomes**.

Ao **Lorenzo T. Vitral**, por todo carinho, incentivo, inspiração e compreensão. Você foi fundamental nesta caminhada.

A minha amiga e colega **Aline Pierote**, por toda ajuda e apoio que me tem dado.

Aos meus amigos do grupo **Amjãh**, especialmente ao **Paulo e Adelson**, que estiveram sempre ao meu lado colaborando de forma incondicional.

Aos meus colegas de turma, pela amizade e companheirismo, em especial á **Catia Cilene Nass Sebrão, Cynthia Tannure Brito, Francisco Meira Brito Jr. e Regina Keiko Nakasone**.

*“Se tivéssemos de escolher entre conhecimento e virtude, a última seria sem
dúvida a melhor escolha, pois é mais valiosa.
O bom coração que é fruto da virtude é por si só um grande benefício para a
humanidade.*

O mero conhecimento, não”.

Dalai – Lama

ADESÃO DE FIBROBLASTOS EM UMA SUPERFÍCIE RADICULAR PREVIAMENTE IRRADIADA COM LASER DE Nd:YAG

Maria das Graças Cruz Najar

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar as alterações ocorridas em superfície radicular previamente irradiada com laser de Nd: YAG, bem como a possibilidade de reinserção de fibroblastos de gengiva humana nesta superfície. Foram usados 12 dentes, extraídos devido ao avançado estado de doença periodontal, que foram raspados e alisados com cureta de Gracey e brocas Perio-Set, e divididos em 3 grupos: um grupo foi irradiado com laser de Nd: YAG, no modo livre (pulso longo) com as seguintes condições: largura temporal de 350 microssegundos, energia por pulso de 30 mJ, frequência de 2 Hz, usando fibra de quartzo de 320µm de diâmetro numa angulação aproximada de 10° em relação ao longo eixo do dente; outro grupo foi irradiado com Nd: YAG no modo chaveado (pulso curto) com as seguintes condições: largura temporal de 10 ns, energia por pulso de 50mJ, diâmetro aproximado de 5 mm.; o outro grupo foi o de controle que não recebeu irradiação. Foram obtidos fragmentos de 5mmX5mm que foram devidamente identificados e autoclavados. Todos espécimes foram plaqueados com 2×10^3 células de fibroblasto de gengiva humana e incubados por 24 horas. Estas células foram fixadas com glutaraldeído e tetróxido de ósmio e preparadas para análise por microscopia eletrônica de varredura. Foram observadas alterações morfológicas nas superfícies irradiadas em graus diferentes. Além disso, as superfícies apresentaram-se compatíveis com a adesão de fibroblastos em graus diferentes, e, nas superfícies irradiadas com pulso longo, observou-se um número maior de células aderidas.

**ADHESION OF FIBROBLASTS IN RADICULAR SURFACE RADIATED
WITH Nd:YAG LASER**

Maria das Graças Cruz Najar

Abstract

This issue aimed to assess the changes occurred in radicular surface previously radiated with Nd:YAG laser, as well as the possibility of new attachment of human gum fibroblasts on that surface. It had been used 12 teeth which were extracted due to the advanced periodontal disease, scaling with curettes and drills, and divided into three groups: one group irradiated with Nd:YAG laser, in the free mode (long pulse) with the following conditions: timing span of 350 microseconds, energy per pulse of 30 mJ, 2 Hz frequency, using quartz fiber of 320 μm of diameter with an approximate angle of 10 with reference to the teeth stem, another group was irradiated with Nd:YAG in the Q-switch (short pulse) with the following conditions: timing span of 10 ns, energy per pulse of 50mJ, approximate diameter of 5 mm; the other group was the control that didn't receive irradiation. Fragments of 5mm x 5mm had been obtained and they were identified and sterilized properly. All the fragments were seeded with 2×10^3 of gingival fibroblast cells and incubated for 24 hours. These cells were fixed with glutaraldehyde and osmium tetroxide and prepared for analyses by scanning electron microscopy. Morphological changes had been observed on the irradiated surfaces, in different levels, and all surfaces showed compatible with the adhesion of fibroblasts in different levels, being observed that on the irradiated surfaces with long pulse, there was a bigger number of adhered cells.

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: comportamento da radiação eletromagnética.

Figura 2: mecanismos de interação laser-tecido.

Figura 3: remoção de cálculo com Perio-set

Figura 4: RAR com cureta de Gracey número 5/6

Figura 5A e B: aparelho de laser de Nd: YAG

Figura 6: irradiação com laser de Nd: YAG com pulso longo

Figura 7: irradiação com laser de pulso curto

Figuras 8 e 9: obtenção dos espécimes em tamanho padronizado

Figura 10: acondicionamento em vidro para a autoclavagem

Figura 11: espécimes acondicionados dentro da Placa de Eliza

Figura 12: identificação dos espécimes

Figura 13: áreas pré determinadas para a obtenção das eletromicrografias

Figura 14: aspecto da superfície radicular do grupo controle

Figura 15: aspecto da superfície radicular do grupo irradiado com Nd: YAG com pulso curto

Figura 16: aspecto da superfície radicular do grupo irradiado com Nd: YAG com pulso longo

Figura 17: adesão celular na superfície radicular do grupo controle

Figura 18: adesão celular na superfície radicular do grupo irradiado com Nd: YAG com pulso curto

Figura 19: adesão celular na superfície radicular do grupo irradiado com Nd: YAG com pulso longo

Figura 20A: Grupo controle sem células

Figura 20 B: Grupo irradiado com Nd: YAG com pulso curto sem células

Figura 20 C: Grupo irradiado com Nd: YAG com pulso longo sem células

Figura 20 D: Grupo controle com células

Figura 20 E: Grupo irradiado com Nd: YAG com pulso curto com células

Figura 20 F: Grupo irradiado com Nd: YAG com pulso curto com células

Lista de abreviatura e símbolos

A- área

Cm - centímetro

λ - Comprimento de onda

CO₂ - Dióxido de carbono

D - densidade

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

E - energia

EDTA - *ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etileno diamino tetracético)

F - fluência

GW - giga watt

°C - graus centígrados

g - gravidade

Hz - Hertz

He-Ne - Hélio-Neônio

HMDS - hexadimetil disilazona

I - intensidade

J - Joule

J/cm² - joule por centímetro quadrado

KW - quilo watt

Laser - *Ligth amplification by stimulated emission of radiation* (Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)

LMF - linhagem celular de fibroblasto de mucosa maastigatória humana

MASER - *Microwave amplified by stimulated emission of radiation* (Amplificação de microondas por emissão estimulada de radiação)

MW - mega Watt

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

μm - Micrômetro

μl - microlitro

mJ - Milijoule

ml - mililitro

mm - Milímetros

nm - Nanômetros

ns - nanosegundo

Nd: YAG - Granada de ítrio-alumínio dopada com neodímio

PBS - *phosphate-buffered saline* (solução tampão fosfato salina)

PBSA - *phosphate-buffered saline absent* (solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio)

PVC - policloreto de vinila soldável

P - potência

Pps - pulsp por segundo

RAR- raspagem e alisamento radicular

Rpm - rotação por minuto

s – segundo

t - tempo

W – Watt

X15 - aumento de 15 vezes

X400 - aumento de 400 vezes

X500 - aumento de 500 vezes

1 - INTRODUÇÃO

Na odontologia, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas envolvendo o uso dos Lasers como recurso principal e/ou como coadjuvante em procedimentos terapêuticos.

Como se sabe, as duas doenças mais prevalentes na cavidade bucal, induzidas por bactérias são a cárie e doença periodontal (Wilson, 1993).

Segundo Prichard (1977) a doença periodontal é causada por múltiplos e complexos fatores, que podem ser metabólicos, irritativos e infecciosos, e os divide em fatores predisponentes, que favorecem a ocorrência da patologia, fatores perpetuantes, responsáveis pela sua cronificação, e fatores modificadores, que podem alterar o curso da doença quando já estabelecida.

A doença periodontal tem como fator etiológico primário, a placa bacteriana ou biofilme ao nível gengival que, em alguns pacientes progride para uma destruição gradativa que se estende em direção apical ao longo da raiz do dente. A fase irreversível da doença é chamada de periodontite crônica, sendo caracterizada pela perda de inserção que resulta na formação de bolsa periodontal, resultado da reabsorção óssea e que pode levar a perda dental periodontal (Carranza, 1983).

O estudo clássico de Løe et al. (1965), documentou a relação entre a participação das bactérias no aparecimento das gengivites e foi preponderante na formulação da hipótese da placa bacteriana não específica, a qual dominou a literatura na década de sessenta.

Já na década de setenta, novos estudos culminaram com o surgimento da teoria da placa específica, em que a espécie bacteriana é mais relevante para o desenvolvimento e perpetuação da doença do que simplesmente a quantidade de placa e seu tempo de acumulação, como se acreditava até então (Socransky, 1997).

Hoje é consenso, que a Doença Periodontal tem origem multifatorial.

Os microorganismos que têm sido associados com a doença periodontal são principalmente Gram-negativos anaeróbios obrigatórios e capnófilos como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus* e vários espiroquetas (Socransky e Haffajee, 1999).

O tratamento empregado para essas doenças induzidas por placa consiste na remoção mecânica ou química dos patógenos.

Sumário

Dedicatória	I
Agradecimentos	II
Resumo	IV
Abstract	V
Lista de Figuras.....	VI
Lista de Abreviaturas e Símbolo	VII
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - OBJETIVO	4
3 - REVISÃO DA LITERATURA	5
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1- O LASER UTILIZADO.....	18
4.2- CULTURA DE CÉLULAS	23
4.3-CONTAGEM DE CÉLULAS NAS ELETROMICROGRAFIAS	27
4.4- ADESÃO CELULAR.....	28
5 – RESULTADOS.....	29
5.1 - SUPERFÍCIES RADICULARES	29
5.2-ADESÃO CELULAR.....	31
6 – DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	34
7 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	35

Entende-se por saúde periodontal, a ausência de sinais clínicos da Doença Periodontal. Dentre eles podemos citar, ausência de sangramento gengival, ausência de mobilidade dental, profundidade de sondagem normal.

O restabelecimento desta saúde pode se dar através da regeneração ou reinserção e como se sabe, a regeneração do periodonto ainda é uma utopia na maioria dos casos, pois implica na formação de um novo osso, novo cemento e novo ligamento periodontal. A reinserção ocorre quando fibroblastos se aderem em cemento e/ou dentina e não depende da formação de novo osso, sendo por isto mais viável.

Mas para que isto ocorra, é necessária a descontaminação deste cemento e/ou dentina e a preservação da biocompatibilidade desta superfície para reinserção destas células.

A cada dia surgem novas propostas de terapia, abordagens alternativas de tratamento que visam melhorar o prognóstico da doença, prevenir recidivas, identificar sítios ativos, facilitar a aplicação clínica e atenuar o desconforto do paciente, sem, contudo criar efeitos secundários indesejáveis.

Tem-se usado a associação de antimicrobianos aos procedimentos de terapia periodontal e também são usados como agentes profiláticos, mas como todo medicamento pode desenvolver resistência bacteriana pelo longo tempo de uso, estabelecimento de patógenos oportunistas e a necessidade de se manter altas concentrações do medicamento por longos períodos (Sankar e Wilson, 1993).

Associações com outros produtos como ácidos, tetraciclina, ácido, fibronectina e outros vêm sendo amplamente pesquisada.

Dentro desta perspectiva, Aleo et al. (1975), compararam a adesão e o crescimento de fibroblastos de gengiva humana sobre superfícies radiculares expostas à doença periodontal. A amostra foi dividida em três grupos: a) tratadas com raspagem e aplanamento; b) tratadas com fenol a 45% ou c) não tratadas. Dentes sadios foram usados como controle. Todos os espécimes foram autoclavados e plaqueados com 1×10^5 células e incubados por 24 e 48 horas. Feita a avaliação pela MEV e os autores constaram que:

- as raízes dos dentes sadios permitiram a adesão celular;
- as raízes não tratadas não apresentaram adesão celular, ou muito pouco;
- as raízes que tiveram a endotoxina removida com raspagem e aplanamento ou fenol a 45%, tiveram as células aderidas e estas cresceram normalmente sobre toda a superfície radicular. Extrapolando estes dados para uma situação *in vivo*,

os autores comentaram que o sucesso clínico dependeria da completa remoção dos materiais tóxicos do cimento doente ou a remoção do próprio cimento.

O emprego do laser na terapia periodontal surge como uma alternativa promissora pelo seu potencial de redução microbiana (Wilson, 1993 e 1994), contribuindo com as técnicas de tratamento convencional das doenças periodontais e suas seqüelas.

Dentro da periodontia o conceito de tratamento periodontal mudou durante as últimas décadas, que era de intervenção cirúrgica, para eliminação da bolsa periodontal, para um tratamento menos traumático. Hoje o objetivo do tratamento é dirigido para a remoção dos agentes etiológicos primários e secundários da doença periodontal que são a placa microbiana, o cálculo dental, dentre outros fatores secundários, para que se tenha uma superfície mais descontaminada e compatível a reinserção de fibroblastos, e também possibilidades para uma regeneração óssea. O uso de laser em tratamento periodontal pode ser o próximo passo para um tratamento menos traumático. Idealmente, o objetivo do tratamento é a limpeza seletiva da bolsa periodontal e remoção dos causadores naturais da doença sem o comprometimento desta superfície radicular que venha comprometer a regeneração do periodonto.

Neste trabalho, foram analisadas as alterações ocorridas no cimento radicular após irradiação com Laser de Nd: YAG, bem como a biocompatibilidade para a reinserção de fibroblastos nesta superfície.

2 - OBJETIVO

O estudo em questão visou, fazer avaliações *in vitro*, através de eletromicrografia, das alterações da superfície do cimento radicular de dentes extraídos devido á Doença Periodontal, após irradiação com Laser de Nd: YAG (1064 nm) usando duas condições diferentes de largura temporal :pulso longo (modo livre), pulso curto (modo chaveado).

Observou-se a biocompatibilidade deste cimento irradiado, pelo nível de adesão de fibroblastos.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

Em 1917, Einstein demonstrou como se poderia obter a amplificação da luz, através da estimulação de um campo eletromagnético.

A partir destes estudos, Townes, em 1951, propôs a amplificação de microondas por emissão estimulada de radiação -MASER- e em 1958, Shawlow e Townes, propuseram usar estes princípios e aplica-los na região do visível do espectro eletromagnético.

Em 1960, Theodore Maiman, um físico da Hughes Research Laboratories, demonstrou que a luz poderia ser estimulada a emitir radiação amplificada (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) e, assim, construiu o primeiro Laser sólido, utilizando o rubi como material.

O laser tem sido utilizado em campos variados, como na área biológica, nas indústrias automotivas, aeroespacial, de vestuário (Lopes e Eduardo, 1999).

Em relação às manobras cirúrgicas utilizando lasers de alta intensidade, como os de CO₂ e Nd:YA, em algumas técnicas como a gengivectomia e gengivoplastia possam ser utilizados com a vantagem da cauterização da ferida no ato cirúrgico, reduzindo sangramento e tempo operatórios. Os demais métodos cirúrgicos periodontais convencionais ainda não foram superados, embora as evidências mostrem uma otimização quando se usa como coadjuvante, os lasers.

Na odontologia, seu uso aconteceu em 1960, quando Stern e Sognnaes, usando o laser de rubi, conseguiram a vaporização de esmalte e dentina.

A utilização dos diversos tipos de laser está sendo estudada em algumas especialidades odontológicas, como dentística, cirurgia, endodontia, entre outras.

Dentro da periodontia, os estudos realizados até hoje não justificam ainda a utilização dos lasers em substituição aos métodos convencionais, porém consideramos os estudos promissores para o futuro, como foi dito anteriormente.

A luz laser tem propriedades que a difere da luz comum, que são:

- Monocromaticidade ⇨ fótons com o mesmo comprimento de ondas;
- Coerência ⇨ fótons que se propagam em fase temporal e espacial o que permite a focalização bem definida e específica;
- Colimação e direcionalidade ⇨ fótons que se propagam numa mesma direção.

As propriedades físicas do laser permitem sua aplicabilidade na odontologia, e seu uso, deve ser feito baseando-se no conhecimento da energia aplicada, nos efeitos de sua interação com os tecidos, onde a energia luminosa se transformará em calor, e na correta utilização para cada caso.

A luz laser interage com um tecido biológico de quatro formas (Maldonado, 2000):

- 1- parte da luz remanescente pode ser absorvida pelos componentes do tecido, levando neste caso a uma transferência de energia para o tecido;
- 2- parte da luz pode ser espalhada dentro do tecido;
- 3- parte da luz pode ser transmitida através do tecido sem atenuação;
- 4- parte da luz pode ser refletida. (Fig.1)

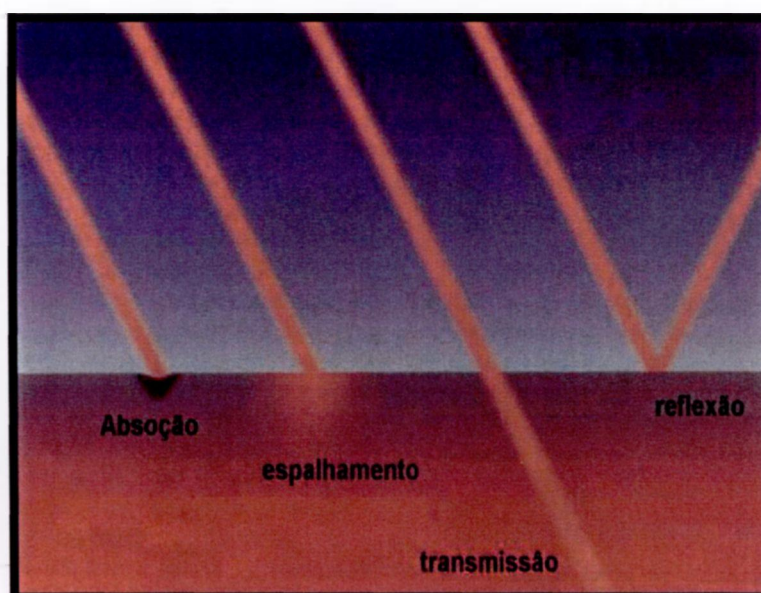


Figura 1: Comportamento da radiação eletromagnética

A onda eletromagnética é capaz de transmitir energia. Energia (E), então, é capacidade de efetuar um trabalho. Calcula-se a energia multiplicando-se a potência em Watts, pelo tempo, em segundos. Sua unidade de medida é o joule (J):

$$\text{Energia (J)} = \text{Potência (W)} \times \text{Tempo (s)}$$

A energia é diretamente proporcional à frequência e inversamente proporcional ao comprimento de onda (λ). Assim, quanto maior o comprimento de onda menor a energia.

$$\text{Energia (J)} = \text{frequência (Hz)} / \text{comprimento de onda } (\lambda)$$

Outras duas grandezas que estão intimamente relacionadas à energia são densidade de potência e densidade de energia. Densidade de Potência ou Intensidade é a quantidade de potência, em Watts, depositada sobre uma certa área, em cm^2 .

$$\text{Intensidade} = \text{Potência (W)} / \text{Área (cm}^2\text{)}$$

A densidade de energia ou fluência, por sua vez é potência, em Watts, multiplicada pelo tempo, em segundos, depositados em uma determinada superfície (cm²); ou, é a energia, em Joules, depositada por área (cm²):

$$\text{Fluência} = P \text{ (W)} \times T \text{ (s)} / \text{Área (cm}^2\text{)} \text{ ou } \text{Fluência} = E \text{ (J)} / \text{Área (cm}^2\text{)}$$

Assim, quanto maior for a energia depositada e menor for a superfície de aplicação, maior será a densidade de energia.

Todas essas medidas físicas são fundamentais na utilização do laser, sendo ele uma forma de energia (Mello e Mello, 2001).

A interação do laser com os tecidos depende de alguns fatores, como, comprimento de onda, características temporais de emissão (contínua ou pulsada), intensidade, largura do pulso, frequência, diâmetro do feixe de luz e, logicamente pela capacidade de absorção do tecido irradiado. Por serem, estes sistemas biológicos complexos e compostos de vários tipos celulares que por sua vez, são envolvidos por tipos diferentes de fluidos teciduais e vascularização (líquido intersticial, vascularização sanguínea e linfática).

Esta absorção dependerá da quantidade de água, por ser ela o maior constituinte do corpo humano, e dos cromóforos que são elementos do tecido e que possuem um alto coeficiente de absorção de um determinado comprimento de onda ou, por uma região do espectro. Cromóforos como a melanina, hemoglobina, proteína e hidroxiapatita, exercem muita influência sobre a interação da radiação e o tecido (Fig. 2)

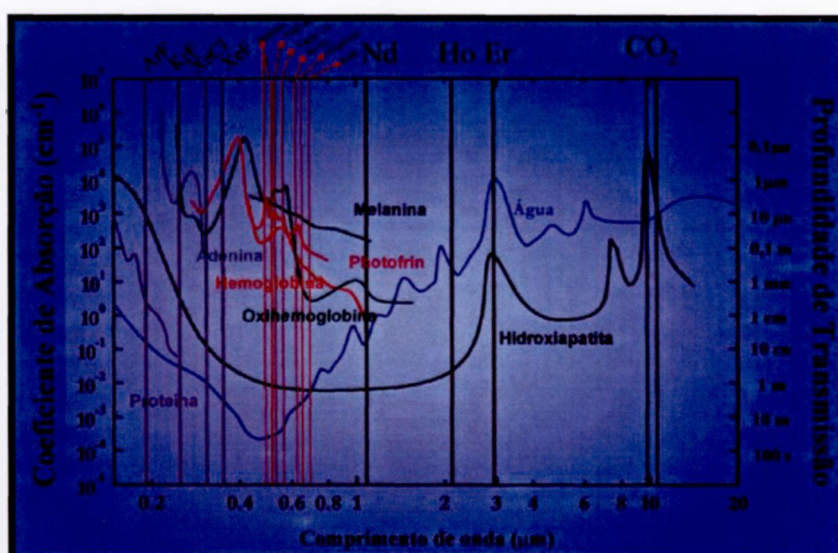


Figura 2: Mecanismos de interação laser-tecido - Edison Puig Maldonado (março, 2000)

Os lasers podem ser divididos em duas categorias: laser de baixa intensidade e laser de alta intensidade.

Laser de baixa intensidade (*soft laser*) tem efeito antiinflamatório, analgésico e biomodulador.

Laser de alta intensidade (*hard laser*) tem maior aplicabilidade em cirurgias, redução bacteriana, ablação e vaporização.

Neste trabalho foi usado o laser de Nd: YAG (neodímio: ítrio- alumínio- granada) que é um laser em alta intensidade, cujo comprimento de onda é de 1,064 μ m, que pode ser usado no modo pulsado e contínuo, com ou sem fibra ótica para entrega do feixe. Estes lasers têm sido usados em cirurgias de tecidos moles e tecidos duros, na cavidade orais.

Como já foi dito, em se tratando da doença periodontal, a aplicabilidade do laser vem sendo estudada tanto na efetividade da redução microbiana, como também na possibilidade de uma regeneração do periodonto ou mesmo uma nova inserção.

Para isto é importante ter conhecimento das alterações causadas pelo laser na superfície radicular, assim como, os danos térmicos ocorridos durante a irradiação, que pode comprometer, por exemplo, a biocompatibilidade desta superfície para que ocorra reinserção de fibroblastos.

Nesta revisão de literatura, foi feito um apanhado de trabalhos, onde se estudou a aplicabilidade, efetividade e consequência da irradiação do laser de Nd: YAG usando vários parâmetros de aplicação, avaliando a redução microbiana, a alteração da superfície radicular que podem torná-la compatível ou não á reinserção de fibroblasto. Para melhor entendimento do conteúdo nem sempre a ordem cronológica será respeitada.

O efeito bactericida causado pelo Nd: YAG (1064 nm), no cemento, se dá em função do aumento da temperatura que promovem no tecido irradiado e é esse o principal motivo dos questionamentos que surgem em relação a sua utilização devido á possibilidade de causar lesão neste tecido e nos circunjacentes.

Pelo fato de o λ do laser Nd:YAG (1064 nm) não ser ressonante com o λ da água, não há grande absorção da luz e esta se espalha pelo tecido resultando em aumento de calor dentro do tecido alvo (Ando *et al.*, 1996).

Horton e Lin, citados por Moritz *et al.*, (1998), obtiveram significativas reduções de *Fusobacterium* ssp. e *Bacteroides* ssp. em bolsas periodontais de adultos com doença periodontal com o uso do laser Nd:YAG (1064 nm) pulsado.

O mesmo resultado foi obtido por Cobb *et al.*, (1992) em relação à *P. gingivalis* e *P. intermedia* usando baixas dosagens de Nd: YAG (1064 nm) (1,75 W; 20 pps; por um

minuto) *in vivo*. O Nd: YAG (1064 nm) também se mostrou capaz de promover a morte de 90% ou mais de algumas bactérias orais, inclusive espécies periodontopatogênicas com 80 mJ e 10 pps por 3 minutos *in vitro*.

Tseng *et al.*, (1991) utilizando o Laser de Nd: YAG (1064 nm) *in vitro* conseguiram uma redução na recolonização bacteriana em dentes tratados com esse laser no seguinte parâmetro: 1,75W, 20 pulsos/s por 30 segundos.

Usando potências menores que as dos trabalhos acima citados Radvar *et al.*, (1996) utilizaram o laser Nd: YAG (1064 nm) com duas potências e densidades de energia diferentes (50 mJ com 62,9 J/cm²; e 80 mJ com 99,5 J/cm²) usando uma fibra paralelamente ao dente e compararam com a raspagem radicular e com o grupo controle, que recebeu apenas orientações de higiene oral. A redução na profundidade de sondagem observada em todos os grupos foi atribuída à melhora nas condições de higienização por parte dos pacientes. Apenas o grupo que recebeu raspagem teve significativa melhora no índice gengival e sangramento à sondagem, o que sugere que o laser usado não foi capaz de reduzir os níveis de inflamação dentro da bolsa. Mesmo com alguma redução bacteriana, o grupo do laser (80 mJ) não obteve melhora significativa nos parâmetros clínicos. Não foram observadas lesões no cimento, o que pode ser devido ao posicionamento da fibra paralelamente ao dente. Esse estudo mostrou que baixas dosagens (50 e 80 mJ) parecem não lesar a superfície dentária ou polpa, mas também não trouxeram melhora aos parâmetros clínicos usados para medir a doença. A integridade da superfície radicular é importante para a reinserção de fibroblastos com já foi dito anteriormente.

Tseng e Liew (1992) observaram uma significativa redução na contagem bacteriana e completa inibição de todos os anaeróbios em dentes irradiados com Nd: YAG (1064 nm) com dosagens maiores que 1 W e 20 pps.

Chan e Chien (1994) investigaram, em seu estudo "*in vivo*", o efeito do laser de Nd:YAG sobre a microbiota periodontal e se as bactérias poderiam ser eliminadas pelo laser com níveis específico de energia e tempo de aplicação nas seguintes especificações: 20 Hz; 01, 03, 06 e 09 W por 05, 10, 20 e 30 segundos. Os resultados do estudo indicam que a flora bacteriana da bolsa periodontal reduziu-se drasticamente em sua quantidade total e que as espécies pigmentadas não foram encontradas, o que demonstrou que o laser foi bastante efetivo na melhora da redução bacteriana.

Lin *et al.*, (1992a), em um estudo "*in vitro*", examinaram pelo MEV o efeito da aplicação do laser de Nd:YAG sobre superfícies radiculares periodontalmente doentes.

Foi feita raspagem e alisamento com curetas de Gracey nesta cemento ou irradiação com laser de Nd:YAG nos seguintes parâmetros: F:20 Hz,P: 2 W,t: 2 min., D:240 mJ). Após observações através do MEV, constatou-se que as raízes tratadas com raspagem e alisamento apresentaram ranhuras profundas e largas, muitas bactérias remanescentes, cálculo brunido e muito *debri* já as irradiadas com Nd:YAG, estavam sem bactérias, crateras superficiais com diâmetro semelhante às fibras de Sharpey, pouco *debri*, houve ablação do material orgânico onde se formou crateras e ressolidificação das estruturas mineralizadas, o cálculo continuava presente.

Coluzzi e Raffeto (1997), realizam o estudo de um caso clínico de curetagem gengival por meio do laser de Nd:YAG, como tratamento coadjuvante da doença periodontal moderada. Foram divididos em 2 grupos, onde no primeiro grupo o tratamento executado foi raspagem e alisamento radicular; e no segundo grupo raspagem e alisamento radicular combinados com curetagem usando o laser de Nd:YAG. Os parâmetros utilizados foram de 30 mJ, 60 Hz, 1,8 W, 30 a 60s por bolsa, seguidos de instrumentação com micro-ultrasom, e, na seqüência, 100 mJ, 20 Hz, 30 a 60s, por bolsa.

O objetivo do tratamento foi a remoção dos tecidos necrosados e infectados. Os resultados demonstraram a efetividade do uso do Nd:YAG laser pulsado, em conjunto com a raspagem e alisamentos radiculares; a combinação foi mais efetiva que a raspagem e alisamento apenas, na melhora dos índices gengivais e de sangramento. Houve uma redução significativa dos patógenos.

Semelhante estudo foi feito por, Trylovich *et al.*, (1992) utilizando Nd: YAG (1064 nm) em superfícies radiculares tratadas com endotoxina *in vitro* empregando 80 mJ, 10 pps por um minuto com fibra ótica de 320µm em contato e perpendicular à área irradiada, esses espécimes foram mergulhados em cultura de fibroblasto. Observaram alterações na biocompatibilidade do cemento que desfavoreceu a inserção de fibroblastos e observou também modificações na sua anatomia como queimaduras, formação de crateras derretimento cementário e fissuras. Em contraposição, Brugnera e Pinheiro (1998) afirmaram que a “vitificação” que ocorre no cemento com a laserterapia favorece a reinserção do periodonto à superfície dental e pode reduzir o freqüente desconforto que acompanha a exposição do cemento.

Possivelmente, estas modificações ocorridas nestas superfícies radiculares se devem ao ângulo de incidência do feixe do laser, o que parece não ter ocorrido no trabalho de Radvar *et al.*, em 1996, que foi *in vivo*, por isto, foi impossível que a incidência fosse em 45°.

Alguns estudos têm sido desenvolvidos no intuito de observar se é relevante ou não a remoção do smear-layer da superfície cementária.

Wilder-Smith *et al.*, (1995) foram capazes de eliminar a smear-layer em superfícies radiculares planas sem induzir lesão microestrutural no tecido duro, usando Nd: YAG (1064 nm) com potência de 5 W por até 3 minutos e com densidade de energia total de 692,01 J/cm².

De acordo com Fróio *et al.*, (2002), o risco de superaquecimento de tecidos duros existe quando o Nd: YAG (1064 nm) é utilizado dentro de parâmetros empíricos.

Radvar *et al.*, (1995), em estudo “*in vitro*”, observaram os efeitos da aplicação do laser de Nd:YAG sobre o cálculo subgengival, dentina e cimento, sob diferentes parâmetros de energia e tempo de exposição. O estudo incluiu dois experimentos. No primeiro, 32 dentes recém extraídos, com cálculo, foram divididos em 8 grupos de testes com diferentes parâmetros: 50mJ, 10 Hz e 01 e 05 segundos. A fibra do laser foi mantida perpendicular em contato com a superfície radicular, usando-se um *jig* calibrado para evitar movimentos.

No segundo experimento, 03 dentes isentos de cálculo foram selecionados e raspados até que julgasse que a camada de cimento tivesse sido removida. Tais dentes foram subdivididos em áreas e receberam as irradiações do laser de Nd:YAG nos mesmos parâmetros do experimento número um. Após a irradiação, os espécimes foram preparados para avaliação à luz do MEV.

Foram criados três índices para quantificar os efeitos do laser sobre os sítios tratados:

- escore 0 (nenhum dano);
- escore 1 (alterações leves, incluindo derretimento superficial);
- escore 2 (alterações moderadas e depressões rasas);
- escore 3 (alterações severas, incluindo crateras profundas com evaporações severas).

Como resultado do experimento obteve-se derretimento de cálculo e de material dentário, dando a impressão de o mineral poder ter sido derretido, e, então, ressolidificado, o que resultou em uma superfície bastante porosa.

Parece que, apesar das diferentes energias e duração da irradiação, houve maiores e mais severas alterações físicas no cálculo, quando comparado ao cimento ou à dentina, talvez devido ao maior potencial de absorção da energia laser por este.

Outro aspecto ressaltado seria o de que, por esse mesmo motivo, maior calor é gerado na área, o que pode afetar tecidos adjacentes. Além disso, notou-se que o laser não poderia evaporar cálculo sem evaporar, também, alguma quantidade de cimento. Assim, essa inabilidade em diferenciar o material estranho da superfície radicular limita a aplicação do laser de Nd:YAG para a remoção de cálculo, em bolsas periodontais.

Cobb *et al.*, (1992) afirmam que em seu estudo *in vivo* o cimento foi lesado apenas quando o Nd: YAG (1064 nm) foi usado com altos níveis de energia (3,0 W com 20 pps ou 150 mJ/pulso e 2,25 W com 20 pps ou 112,5 mJ/pulso) por longo tempo (3 minutos/sítio). Baixos níveis de energia (1,75 W com 20 pps ou 87,5 mJ/pulso) e curtos períodos de exposição (um minuto/sítio) deixaram a superfície relativamente plana e alterações consideravelmente menores.

Semelhante a estudos anteriores, como por exemplo de Trylovich (1992) e Morlock *et al.*, (1992), observaram algumas consequências indesejáveis observadas após o uso do laser Nd: YAG (1064 nm), com potências de 1,25 e 1,50 W, foram a carbonização e queimadura do cimento, formação de pequenas cicatrizes e crateras e sinais de amolecimento e ressolidificação da raiz. Essas alterações no cimento apresentaram profundidade média de 20-30 μm e diâmetro variando entre 10 a 100 μm , conforme avaliação de Morlock *et al.*, (1992), que irradiaram superfícies radiculares após raspagem *in vitro*, com parâmetros mais baixos e observou que mesmo assim, o laser causou injúrias a estas superfícies.

Em alguns casos desse estudo houve exposição da dentina subjacente e túbulos dentinários quando, após a exposição ao laser, essas superfícies foram raspadas com instrumentos manuais.

Morlock *et al.*, (1992) afirmam também, que em áreas onde a espessura do cimento é pequena, como no terço coronal da raiz, é maior a chance de ocorrer o chamado “*peeling*” do cimento. Nesse processo ocorre a exposição da dentina subjacente e dos túbulos dentinários quando, após a ação do laser, a junção cimento-dentinária é raspada manualmente. Essas regiões são geralmente pouco mineralizadas e a matriz de colágeno não é bem organizada. Áreas onde a espessura do cimento é maior são menos susceptíveis a esse tipo de acontecimento. Essa poderia ser a razão para a hipersensibilidade ao frio e quente ocorrida em alguns dentes após o uso do Nd:YAG (1064 nm) observada por Radvar *et al.*, (1996).

Mozammal *et al* em 2001, estudaram alterações morfológicas em superfícies de esmalte e dentina. Sabe-se que a superfície radicular pode ser constituída de cimento e/ou

dentina. Neste estudo, usou-se os parâmetros de 1,2 e 3 W, com 20 pps. As alterações encontradas conferiram a estas superfícies, um aumento de resistência ao ataque de ácidos. Observaram uma superfície coberta por *smear layer* derretida e resolidificada, que obstruíam os túbulos dentinários.

Israel *et al.*, (1997) observaram as alterações morfológicas nas superfícies radiculares de dentes sadios raspadas e alisadas, irradiadas com laser de Er:YAG com “spray” de água e com laser de CO₂ ou Nd:YAG com ou sem irrigação.

Os espécimes foram irradiados com uma densidade de energia variável: com CO₂ de 100 a 400J/cm²; com Nd:YAG, de 286 a 1857J/cm²; e com Er:YAG, de 20 a 120J/cm². Os espécimes foram preparados para MEV. Nos dentes raspados, a superfície estava coberta com “smear layer” e apresentava riscos paralelos da instrumentação. As alterações presentes após irradiação com laser de CO₂ ou Nd:YAG foram cavitação, glóbulos de mineral derretido e resolidificado, irregularidades e camadas carbonizadas. A irrigação diminuiu a severidade dessas alterações.

Baraldi e Puricelli, observaram em trabalhos de apicetomia, que o laser de Nd: YAG era capaz de promover fusão e recristalização da *smear layer* nas superfícies radiculares onde predominavam dentina. Usaram potências médias de 1,6 W, 2,0 W e 2,4W; com fibra ótica a 2 mm de distancia durante 30 segundos.

Radvar (1996) em seus estudos demonstrou que o laser de Nd: YAG alteram as propriedades físicas e biológicas da superfície cementária dependendo da energia usada. Danos têm sido relatados quando usada energia de 80mJ e 10 pps em varredura. Neste estudo foi usado laser de Nd: YAG com comprimento de onda de 1064 nm, usados parâmetros entre 50 e 80 mJ e 10pps, no modo pulsado com pulso de duração de 150 µs usando fibra ótica de 320 µm, em contato paralelamente à superfície radicular, onde a densidade de energia variou entre 62,9 J/cm² e 99,5 J/cm² onde foi avaliado danos no cimento radicular, redução de anaeróbicos e melhora clínica da doença periodontal. Este estudo foi feito *in vivo* e posteriormente *in vitro*. À observação no MEV, ao contrário do que se esperaria encontrar, isto é, áreas de derretimento e resolidificação de material inorgânico, além de formação de crateras neste cimento conforme relatos feitos por Cobb em 1992, Trylovich em 1992, não foram encontradas alterações significativas. Esta diferença de resultados, encontrada nestes trabalhos, pode ser atribuída à variação na inclinação da fibra ótica. Neste estudo, Cobb *et al.*, usou uma energia de 1,75 W, em torno de 87 mJ e 2 pps *in vivo* observou significativa redução bacteriana, entretanto houve danos na superfície cementária.

Com o intuito de otimizar resultados, estudos têm sido feitos, com associação de técnicas, dentre elas a do uso de ácidos, de fibronectina, de tetraciclina e de EDTA.

Terranova & Martin (1982) demonstraram os efeitos da adição de fibronectina em raízes parcialmente desmineralizadas, favorecendo a adesão de fibroblastos. Cabem estudos em situações onde se associa a irradiação com laser, à descontaminação com algum agente químico para obter melhores resultados.

Fernyhough & Page (1983) estudaram a adesão, o crescimento e as características morfológicas de fibroblastos de gengiva humana sobre superfícies radiculares de dentes extraídos sadios ou com doença periodontal. Também analisaram o efeito da cobertura das raízes com fibronectina ou desmineralização com ácido cítrico. Os dentes, raspados e aplanados até a obtenção de uma superfície lisa e dura, foram seccionados longitudinalmente. Alguns espécimes foram cobertos com fibronectina e outros colocados em ácido cítrico. A amostra foi dividida em três para a verificação da adesão celular, da seguinte forma:

- I. Raspagem e alisamento radicular;
- II. Raspagem e alisamento radicular associado com fibronectina;
- III. Raspagem e alisamento radicular associado com ácido cítrico;

Os espécimes foram plaqueados com células e incubados por 4 horas. Usou-se um contador eletrônico. Observaram que as células aderiram em raízes bem raspadas e aplainadas. A associação com o pré-tratamento químico, tanto com a fibronectina quanto com o ácido cítrico levou a um aumento na adesão celular após 84 horas, embora essa adesão fosse de forma incompleta e não uniforme.

Quanto ao acompanhamento do crescimento celular, usaram só os espécimes que receberam tratamento com ácido cítrico, os quais foram plaqueados com células e incubados por 0, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 84 ou 108 horas. Usam também um contador eletrônico. Houve mais adesão e crescimento celular nos espécimes onde foi feito o pré-tratamento químico.

Cogen *et al.*, (1984) observaram o efeito de diferentes tratamentos da superfície radicular na adesão e no crescimento de fibroblastos de gengiva humana. Dentes extraídos com doença periodontal foram divididos em quatro grupos: 1) sem tratamento; 2) somente aplicação de ácido cítrico; 3) somente raspagem e aplanamento ou 4) raspagem e aplanamento + aplicação de ácido cítrico. Os espécimes foram autoclavados, plaqueados com 5×10^4 células e incubados por 72 horas. Analisaram os resultados histologicamente e através de MEV. Os espécimes não tratados ou tratados somente com ácido cítrico não

apresentaram células aderidas. No entanto, as superfícies raspadas e aplanadas seguidas ou não pela aplicação do ácido cítrico, favoreceram a adesão e o crescimento dos fibroblastos. Estas células eram planas, com morfologia normal e pareciam aderidas à superfície radicular através de microvilosidades ou filipodos.

Trylovich *et al.*, (1992) analisaram o efeito do laser de Nd: YAG em superfícies radiculares, através da adesão de fibroblastos de gengiva humana. Fragmentos de 4mm x 4mm de dentes sadios foram divididos em três grupos: a) controle, sem tratamento; b) tratamento com endotoxina ou c) tratamento com endotoxina associada ao laser. Os espécimes ficaram submersos numa solução de endotoxina de *E.coli* por 72 horas. Aqueles destinados a aplicação do laser, foram irradiados com Nd:YAG, fibra ótica de 320 µm de diâmetro, perpendicular à superfície, energia de 80 mJ, frequência de 10Hz e tempo de 1 minuto. Os fragmentos foram plaqueados com $2,5 \times 10^5$ células, incubadas por 40 horas e processados para MEV.

O grupo endoxina associada ao laser apresentou um número de células significativamente menor do que os outros dois grupos. As superfícies apresentaram carbonização, formação de crateras, derretimento do cimento e trincas. Os resultados sugeriram que a irradiação com o laser alterou a biocompatibilidade da superfície do cimento, tornando-o desfavorável à adesão de fibroblastos.

Babay (2001) analisou a adesão de fibroblastos de gengiva humana sobre superfícies radiculares com doença periodontal e tratadas com raspagem e/ou condicionamento. Os dentes selecionados foram divididos em três grupos de 1/2 faces foram tratadas mecanicamente com os seguintes instrumentos: a) cureta Gracey 7/8; b) ultra-som piezo-elétrico EMS (Nyon, Suíça) ou c) ultra-som piezo-elétrico Amdent (Nynäshamm, Suécia). Obtiveram fragmentos contendo 1/2 face instrumentada e 1/2 face não instrumentada. Esses foram re-divididos em quatro grupos que receberam, por 3 minutos, os seguintes tratamentos: 1) solução salina; 2) ácido cítrico; 3) hidrócloro de tetraciclina ou 4) EDTA 8%. Todos os espécimes foram plaqueados com 1×10^5 células, incubados por 72 horas e processados para MEV.

Não houve adesão de fibroblastos nas faces não instrumentadas. As superfícies raspadas estavam lisas e aplanadas com grupos de células localizadas; quando tratadas quimicamente apresentavam-se mais rugosas e com fibroblastos espalhados. As superfícies tratadas com ultra-som, EMS ou Amdent, não apresentaram células; porém, quando condicionadas, houve um aumento significativo do número de fibroblastos aderidos. Essas células eram planas, com microvilosidades e filipodos, formando multicamada cobrindo a

superfície. Concluíram que os fibroblastos não aderiram em dentes com doença periodontal não tratados; apresentou-se em pequeno número sobre superfícies raspadas e eram abundantes nas raízes condicionadas, sem diferença entre os agentes utilizados. Além disso, notaram que as células aderiram mais sobre superfícies rugosas do que lisas.

Tewfik *et al.*, (1994) analisaram o efeito do laser de Nd: YAG sobre superfícies radiculares sadias através da adesão fibroblastos de gengiva humana. Todos os dentes selecionados foram raspados e aplanados e a amostra dividida em quatro grupos: a) controle; b) aplicação do laser a 5mm de distância; c) aplicação do laser a 3mm de distância ou d) aplicação do laser a 1mm de distância. A irradiação foi realizada com fibra ótica de 600µm de diâmetro, perpendicular à superfície radicular, com potência de 4 Watts e tempo de aplicação de 1 segundo. Os espécimes foram plaqueados com $7,5 \times 10^3$ células, incubadas por 24 horas e processados para MEV.

O grupo controle (só raspagem) apresentou uma superfície plana, com textura granulosa, decorrente da presença do “smear layer”. Com relação à adesão dos fibroblastos, esse grupo mostrou uma monocamada de células aderida ao cimento. Nos grupos irradiados, a quantidade de células estava diretamente relacionada com a quantidade de energia recebida: quando o laser incidiu a 5mm de distância, os resultados foram semelhantes aos encontrados no grupo controles; conforme a distância diminuía, aumentando a energia, o número de células também ficava menor. Os autores concluíram que a adesão celular foi modificada pela aplicação do laser, estando diretamente relacionada à quantidade de energia liberada na superfície radicular.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Foram usados 12 dentes extraídos devido ao avançado estado de doença periodontal. Como critério de inclusão, foram respeitadas as seguintes características:

- os pacientes eram adultos, de idades variadas;
- de ambos os sexos;
- foram usados dentes unirradiculares (caninos, incisivos laterais e incisivos centrais);
- presença de cálculo nas superfícies radiculares destes dentes.

Os dentes foram extraídos e colocados em solução de cloreto de sódio a 0,9% (soro fisiológico) até o momento de serem autoclavados. Após serem autoclavados, foram armazenados em soro fisiológico e guardados em temperatura ambiente até serem processados. Foi raspada e alisada uma face proximal de cada dente, enquanto que a outra foi conservada sem qualquer tratamento. Para a remoção de cálculo da superfície radicular dos dentes, foram usadas brocas PerioSet, da Intensiv Swiss Dental Products (nº 675, 640, 615), com granulometria de 75µm a 15µm, com rotação de 5.000 r.p.m. , usando motor KaVo , sob refrigeração com água destilada (**Fig.3**) (**Fig.4**). Posteriormente, os dentes tiveram suas superfícies radiculares trabalhadas com curetas de Gracey nº 5/6, da marca Hu-Friedy, para otimização da raspagem e promoção de um alisamento maior. Essas curetas foram devidamente afiadas usando uma Pedra da Índia marca Norton. Cada dente, com uma face previamente raspada e alisada, foi então levado ao laboratório para ser irradiado.

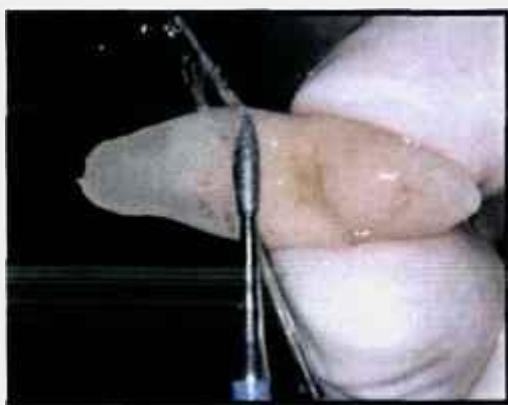


Figura 3: remoção de cálculo com Perio-set



Figura 4: RAR com cureta de Gracey número 5/6

4.1 - O LASER UTILIZADO

O laser Nd: YAG foi escolhido porque, de acordo com os trabalhos de WHITE et al.; 1994; LIU et al.; 1997; YONAGA et al.; 1999, é o que tem sido mais eficaz e o que tem causado menos efeitos indesejáveis ao dente (trincas e danos à polpa devido ao aquecimento), quando usado nos parâmetros adequados. O aparelho de laser usado, pertence ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), protótipo fabricado pelo grupo Laser de pesquisadores desta Instituição (**Fig. 5**), com as seguintes especificações:

- a. sistema de entrega de feixe: fibra de quartzo;
- b. diâmetro da fibra = $320\mu\text{m}$;
- c. comprimento de onda $\lambda = 1064\text{ nm}$;
- d. feixe guia He-Ne ($\lambda = 632\text{ nm}$);
- e. Frequência = 2Hz (2pps);
- f. Energia= 70 mJ/ pulso;
- g. Angulação = aproximadamente 10° ;
- h. Área irradiada = aproximadamente 5mm x 5mm (área pré-delimitada)
- i. Tempo de exposição = irradiação por varredura durante 3 minutos.
- j. A área delimitada de 5mmX5mm foi totalmente irradiada e para isto foram gastos 30 segundos. Esta operação foi repetida 6 vezes, o que durou 3 minutos (tempo de exposição).

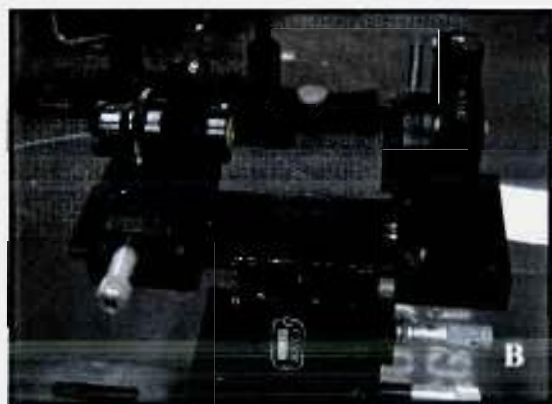
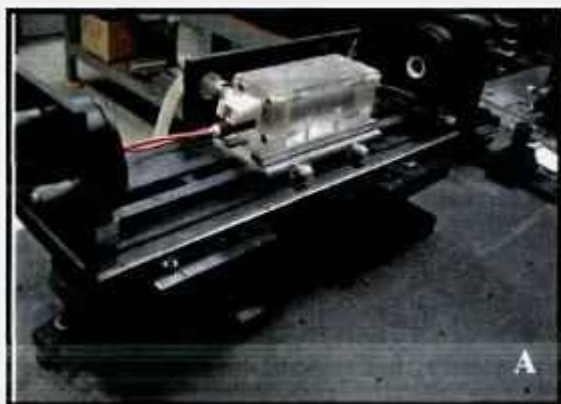


Figura 5A e B: Aparado de laser de Nd: YAG

O laser de Nd: YAG foi usado com duas condições diferentes de largura temporal: pulso longo (modo livre) e pulso curto, ou seja, no modo chaveado. No modo livre, foram utilizadas as seguintes condições:

- Largura temporal - 350 microsegundos;
- Energia por pulso - 30 mJ;
- Taxa de repetição – 2 Hz;
- Densidade de energia de pulso-38J/cm²
- Intensidade- 110KW/cm²

No modo livre foi utilizada a irradiação com fibra óptica em contato e inclinação de 10 graus entre o eixo do feixe e a superfície do dente. Foram feitos movimentos de varredura com velocidade constante de maneira a cobrir toda a área desejada procurando-se não causar sobreposição demasiada de dois pulsos subseqüentes e nem deixar lacunas entre eles (Fig 6).

No modo chaveado, foram utilizadas as seguintes condições:

- Largura temporal - 10 ns
- Densidade de energia/pulso-0,26J/cm²
- Intensidade-26 MW/cm²
- Energia por pulso – 50 mJ
- Diâmetro do feixe – estimado em 5mm de diâmetro
- Taxa de repetição-2 Hz

No modo chaveado não foi possível a realização da irradiação do dente com a utilização da fibra óptica. Devido à alta intensidade do feixe laser ao ser focalizado sobre a superfície da fibra óptica (de aproximadamente 6 GW/cm²), esta seria danificada com a incidência de apenas um pulso laser. A alternativa escolhida para esta irradiação foi a de focalizar o feixe com uma lente de comprimento focal de 20 cm, e escolher uma posição ao longo da trajetória do feixe onde a superfície irradiada não sofresse um dano macroscopicamente visível. Isto podia ser visualizado pela presença de um brilho intenso, semelhante a uma faísca, sobre a superfície da amostra. Neste caso, não havia carbonização (pelo menos para um pequeno número de pulsos), mas podiam-se visualizar danos macroscópicos na superfície. Assim, procuramos uma posição onde o diâmetro do feixe

fosse grande o suficiente para que este dano não ocorresse. A amostra foi então posicionada fora do foco e foi procurada uma posição (varredura axial do feixe) em que, usando a energia máxima, não houvesse dano visível à superfície do dente. Nesta posição, a superfície do dente foi inclinada em relação à direção de incidência do feixe de tal maneira que o ângulo formado entre o feixe e a superfície da amostra fosse de aproximadamente 10 graus, simulando uma situação *in vivo*. O diâmetro do feixe neste ponto era grande o suficiente para cobrir toda a área demarcada (Fig. 7).

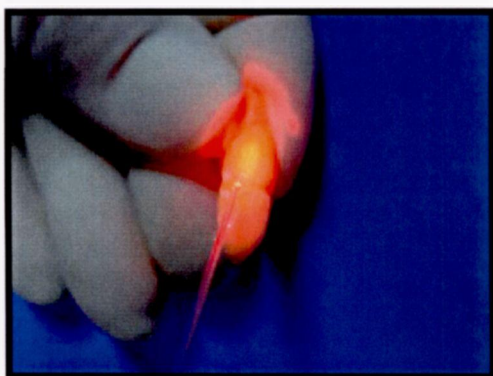


Figura 6: irradiação com laser de Nd: YAG com pulso longo.

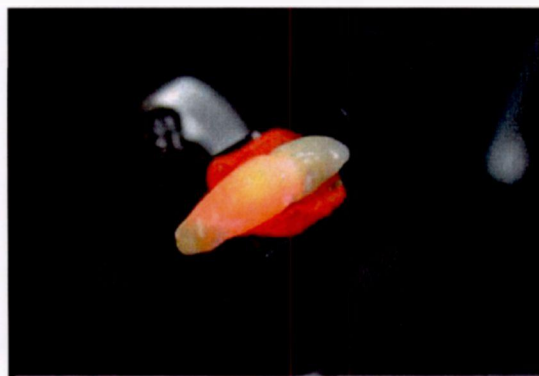


Figura 7: irradiação com laser de pulso curto.

Parâmetros de utilização

	Pulso curto (chaveado)	Pulso longo (livre)
Largura temporal	10 ns	350 microsegundos
Energia por pulso	50 mJ	30 mJ
Taxa de repetição	2 Hz	2Hz
Diâmetro do feixe	+/- 5 mm	320 μ m
Densidade de energia por pulso	0,26 J/cm ²	38 J/cm ²
Intensidade	26 MW/cm ²	110KW/cm ²

Após a irradiação, as coroas dos dentes foram incluídas em resina acrílica transparente Resigel, dentro de tubos de PVC de 2,5 cm de diâmetro, cortados com 1,5 cm de altura. Essas coroas foram incluídas, deixando a área irradiada da porção radicular (pré-delimitada) exposta.

Após a polimerização final da resina, este conjunto foi ajustado e fixado numa morsa ligada a uma máquina de corte de precisão –LABCUT- EXCTEC Cylindrical Holder, XL 10026, EXCEL Technologies Inc., Connecticut, USA. Os cortes foram feitos por meio de um disco diamantado de 3 polegadas de diâmetro externo e 0,30 mm de espessura, em rotação de 350 r.p.m.

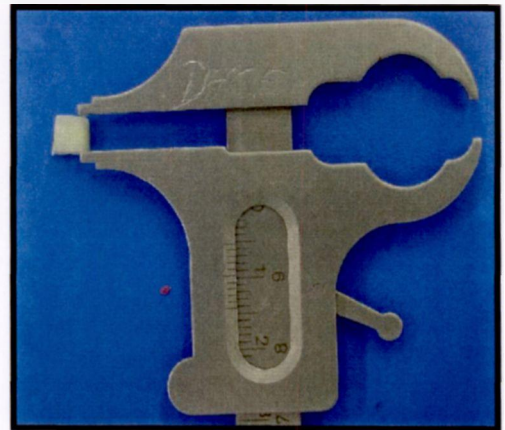
O primeiro corte foi no sentido ápico cervical, ocasião em que a raiz foi dividida ao meio e foi preservada a face proximal que recebeu a irradiação.

O conjunto foi retirado da morsa e levado à Politriz –ECOMET 3 Grinder/Poliser, Buehler Ltda., Illinois, EUA, para a obtenção de um espécime de 5mm de largura.

Novamente o conjunto foi preso à morsa para assim obter os espécimes de 5mmx5mm, confirmadas através de um paquímetro. (Fig. 8 e 9).

Estes espécimes foram novamente acondicionados em vidros devidamente identificados e autoclavados (Fig. 10).

Durante e após todos os tempos operatórios, estas amostras foram mantidas em soro fisiológico.



Figuras 8 e 9: obtenção dos espécimes em tamanho padronizado.



Figura 10: acondicionamento em vidro para a autoclavagem.

4.2- CULTURA DE CÉLULAS

Neste trabalho, foi utilizada a linhagem de células LMF obtidas a partir de gengiva humana (Almeida-Lopes *et al.*). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica. Essas células foram incubadas em ambiente úmido, a 37°C, numa atmosfera contendo 95% de ar 5% de dióxido de carbono. Estas células foram monitoradas através de microscópio invertido de fase. O subcultivo foi feito quando as células atingiam a subconfluência.

O meio de cultura do frasco de cultivo foi pipetado com uma pipeta elétrica (Pipetus®) trabalhando sempre dentro de uma capela de fluxo laminar. Por duas vezes foi feita a lavagem com solução tampão PBS. A seguir, as células foram separadas com 2ml de uma solução de tripsina EDTA a 0,25% (da Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) durante 2 minutos a 37°C. A tripsina foi então inativada com 5ml de meio de cultura contendo soro fetal bovino e DMEM 10 e levadas a uma centrífugadora a 300 g, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após a remoção do tubo da centrífugadora, foi feita a aspiração do meio de cultura, usando um aspirador Nevone, tomando-se o cuidado de não aspirar as células que estavam decantadas no fundo do tubo de ensaio. As células foram ressuspensas em 1ml de meio fresco. Para os experimentos de adesão, foram plaqueadas as mesmas quantidades de células sobre todos os fragmentos (9 no total, 3 em cada grupo experimental) de todos os grupos. Foram usadas para o plaqueamento 2×10^3 células sobre os espécimes. Para obtenção dessas células, foi realizada a seguinte contagem: aquelas células que cresceram nos frascos foram separadas através de tripsinização e após a obtenção da suspensão de células, essas foram centrifugadas por 5 minutos a 300g e o precipitado de células ressuspensas em 1ml de PBSA. Desta suspensão, 100µl foram retirados, e a ela juntou-se 800 µl de PBS e 100 µl de azul de Trypan.

Numa câmara de Neubauer ou câmara de um hemocitômetro, foi colocada esta suspensão de células para serem contadas sob microscópio de luz. O número total de células originadas do frasco foi obtido através da seguinte equação matemática:

$$\text{Número total de células contadas} \times \text{diluição} \times 10^4$$

nº de quadrados do hemocitômetro usado para contagem

Somente as células mortas são penetradas pelo Azul de Trypan, devido a lesões da membrana celular, portanto aparecem coradas.

As células foram colocadas sobre os espécimes que estavam em uma placa de cultivo celular (**Fig.11**) .

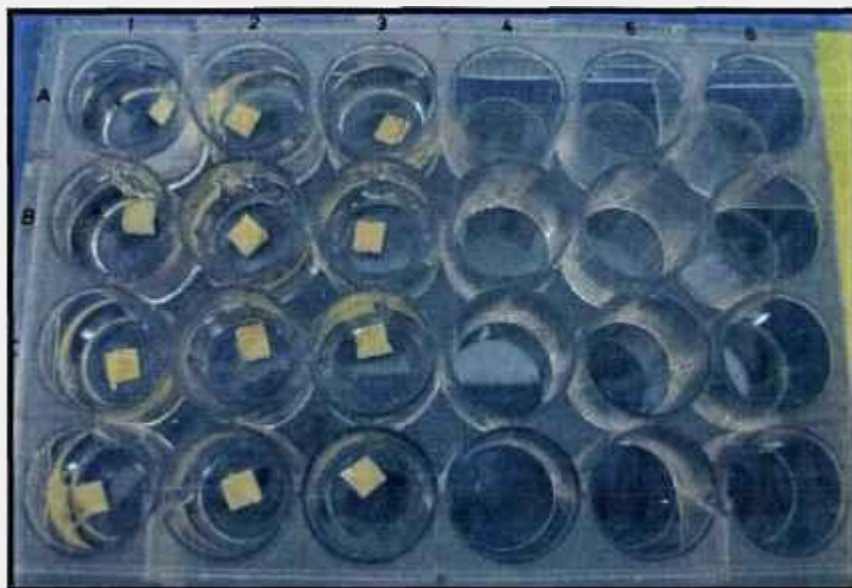


Figura 11- espécimes acondicionados dentro da Placa de cultivo celular-

- Nos compartimentos da primeira fileira, foram colocados os espécimes do grupo 1- controle, que foram plaqueados com as células.
- Nos compartimentos da segunda fileira, foram colocados os espécimes do grupo 2-pulso curto, que foram plaqueados com as células.
- Nos compartimentos da terceira fileira, foram colocados os espécimes do grupo 3-pulso longo, que foram plaqueados com as células.
- Nos compartimentos da quarta fileira, foi colocado um espécime de cada grupo, porém, sem células, somente recobertos com o meio de cultura DMEM.

O objetivo deste último compartimento foi a observação de alguma possível alteração causada pelo meio de cultura à superfície radicular (**Fig.12**).



Esses espécimes, devidamente recobertos, foram levados à estufa de CO₂ a 37° C por 24 horas. Após este tempo, foi feita a fixação destas células com solução de glutaraldeído a 2,5% (Glutaraldehyde, 10 x 10 ml, 25% solution, EM Grade, Electron Microscopy Sciences) em tampão fosfato de sódio 0,1M por 2 horas à temperatura ambiente .

Esta placa de cultivo celular foi levada à geladeira (temperatura média), onde ficou guardada por 72 horas. Para a continuidade do trabalho, esta placa foi levada ao banho Maria, até a temperatura de 36,5°C, quando então foram feitas três lavagens com solução tampão fosfato de sódio 0,1Molar a cada 5 minutos, o que teve como objetivo a retirada do glutaraldeído.

Após a lavagem, foi feita a pós-fixação com solução de tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 20 minutos.

Em seguida, as amostras foram levadas para dentro da capela, quando todo o tetróxido de ósmio foi retirado e iniciou-se a desidratação em série crescente em etanol. Foi usado álcool a 30% por 3 vezes durante 5 minutos cada vez. Passou-se para álcool a 50% por 2 vezes durante 5 minutos cada vez: em seguida, álcool 70% por 2 vezes também

durante 5 minutos cada vez. Após isso, durante o mesmo tempo, foi usado álcool a 90% e 96%, e, por último, foi usado álcool absoluto 4 vezes por 5 minutos cada vez.

Foram feitas três lavagens de 5 minutos cada, com solução tampão fosfato a 0,1M. Os espécimes foram recobertos com HMDS (Hexamethyl-Disilazane, store at 2 to 8° C, Laboratório Sigma) durante 20 minutos dentro da capela, onde havia circulação constante de ar. Depois dos 20 minutos, toda solução de HMDS foi retirada com auxílio de pipetas e esperou-se pela secagem completa dos espécimes por 2 horas aproximadamente.

Após a secagem as amostras foram submetidas ao processo de “sputtering”, sendo cobertas com uma camada de ouro com 120 nm -BAL-TEC, SCD 050, Sputter coater.

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em microscópio eletrônico de varredura JXA-6400. Electron probe microanalyzer, JEOL, do Centro de Tecnologia da Marinha de São Paulo - CTMSP. Os fragmentos foram fotografados no microscópio eletrônico de varredura com distancia focal de 20 nm e aumento de 400X e 500X.

4.3 - CONTAGEM DE CÉLULAS NAS ELETROMICROGRAFIAS

Todos os fragmentos foram fotografados no microscópio eletrônico de varredura com distância focal de 20mm e aumento de 400X.

Foram obtidas eletromicrografias de 5 áreas de cada fragmento, conforme a numeração da figura abaixo (Fig.13):

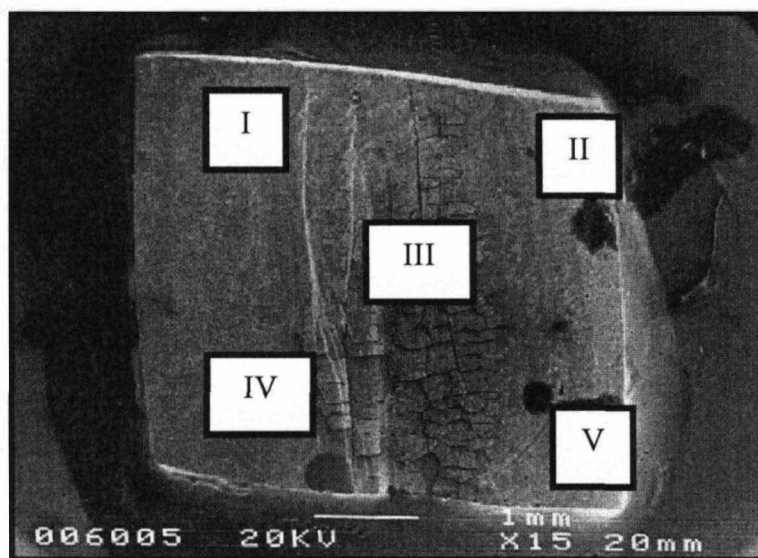


Figura 13 : Áreas pré determinadas para a obtenção das eletromicrografias

4.4 - ADESÃO CELULAR

Um examinador calibrado realizou as contagens e as células contadas uma a uma. Foram utilizados os dados obtidos na contagem de células aderidas aos fragmentos dos três grupos experimentais, em triplicatas.

5 - RESULTADOS

Os resultados foram analisados, através de eletromicrografia de varredura, com aumento original de 400X e distância focal de 20mm.

5.1- Superfícies radiculares

Superfície do grupo controle-a superfície do grupo tratado com raspagem com curetas e brocas apresentou aspecto homogêneo e liso, sem exposição dos túbulos dentinários e recoberta por “smear layer” (Fig.14).

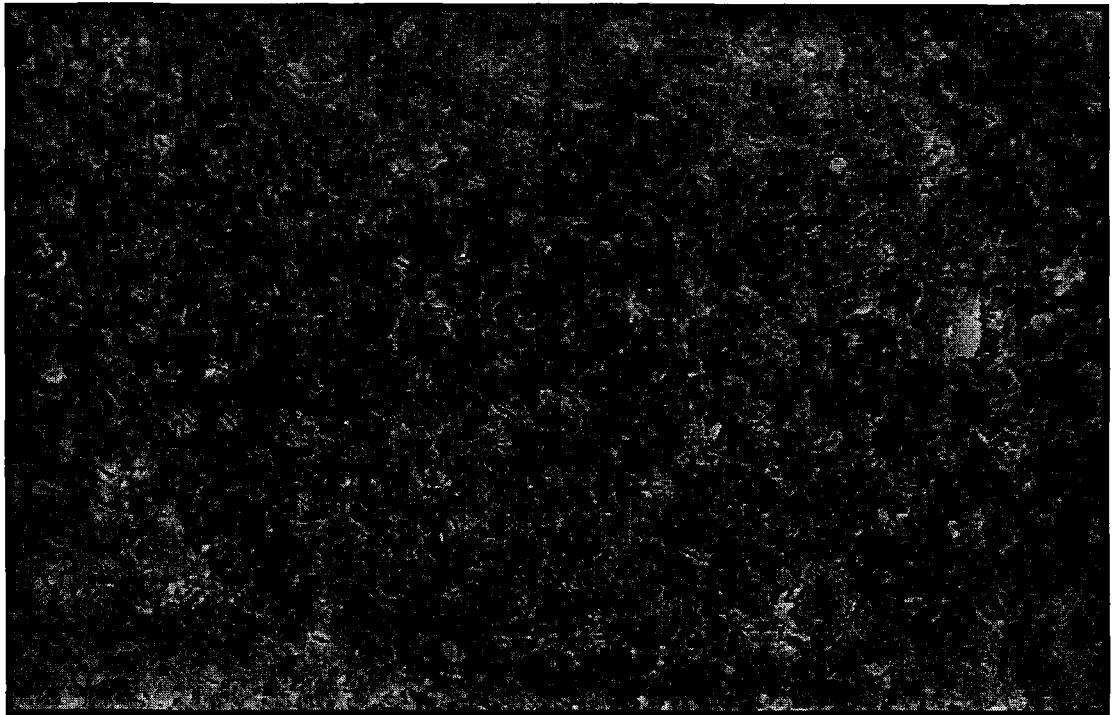


Figura 14: aspecto da superfície radicular do grupo controle.

Superfície do grupo irradiado com Nd: YAG com pulso curto-a superfície apresentou áreas lisas e vitrificadas de permeio a trincas em diversas direções e que se anastomosavam, sem exposição de túbulos dentinários (Fig. 15).

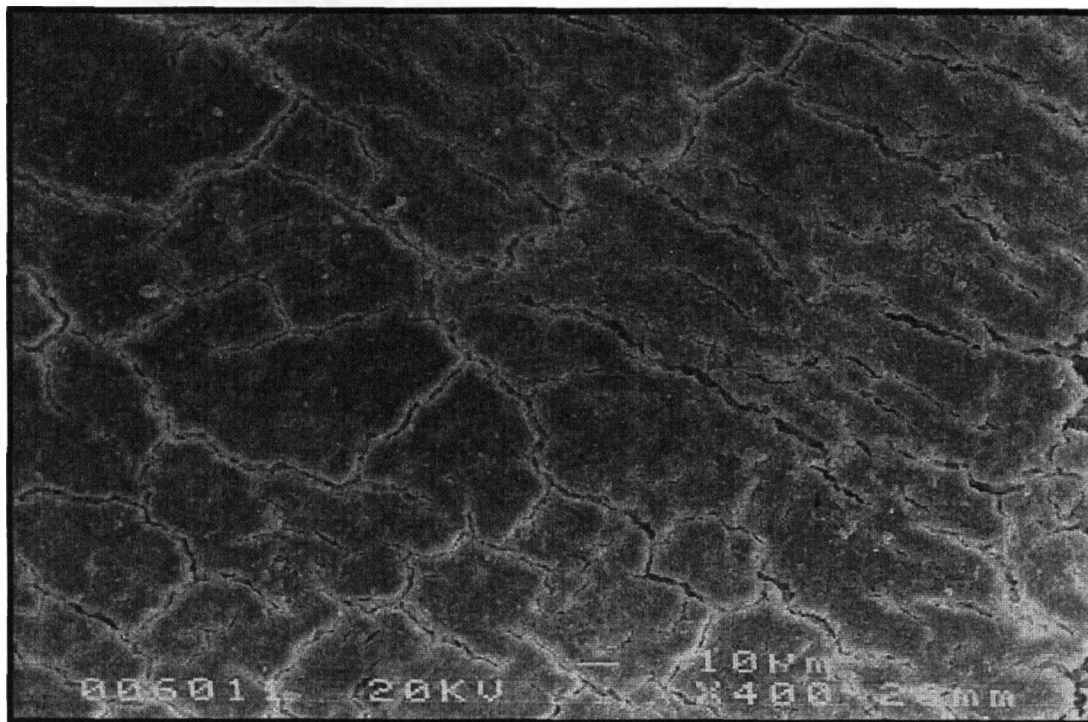


Figura 15: aspecto da superfície radicular do grupo irradiado com Nd: YAG com pulso curto

Superfície do grupo irradiado com Nd: YAG com pulso longo-a superfície apresentou uma rugosidade regular, com mínima presença de trincas, que são em geral curtas e não se anastomosam. Material semelhante ao “smear layer” também é observado nesta superfície em pequena quantidade (Fig.16).



Figura 16: aspecto da superfície radicular do grupo irradiado com Nd: YAG com pulso longo

5.2 - Adesão celular

Sobre todas as superfícies, tanto das amostras controle quanto das tratadas, foi possível observar variadas quantidades de células aderidas. Algumas células apresentaram-se arredondadas, outras com aspecto ora fusiforme ora estrelário.

Sobre as superfícies do grupo controle, foram observadas poucas células aderidas, numa média de 4 células por eletromicrografia (**Fig.18**). Já nas superfícies tratadas, o número de células aderidas foi maior, sendo em media 6 por eletromicrografia do grupo tratado com Nd: YAG pulso curto (**Fig. 19**) e 11 grupo tratado com Nd: YAG pulso longo (**Fig.17**).

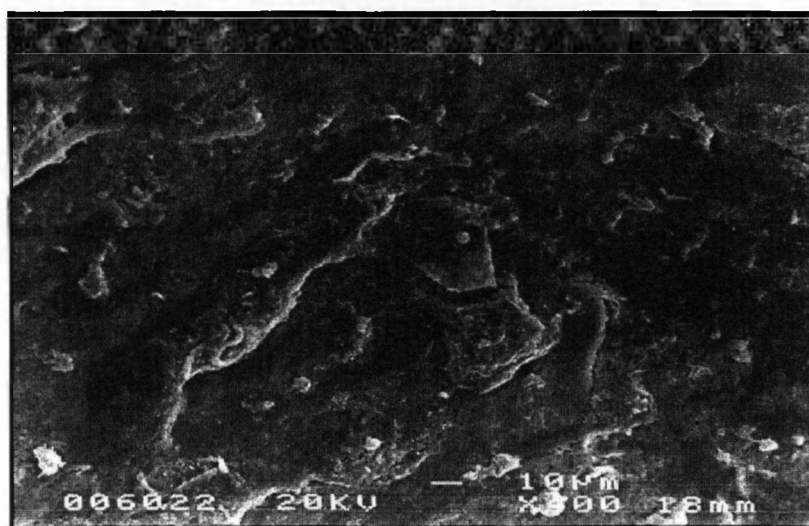


Figura 17: adesão celular na superfície radicular do grupo controle

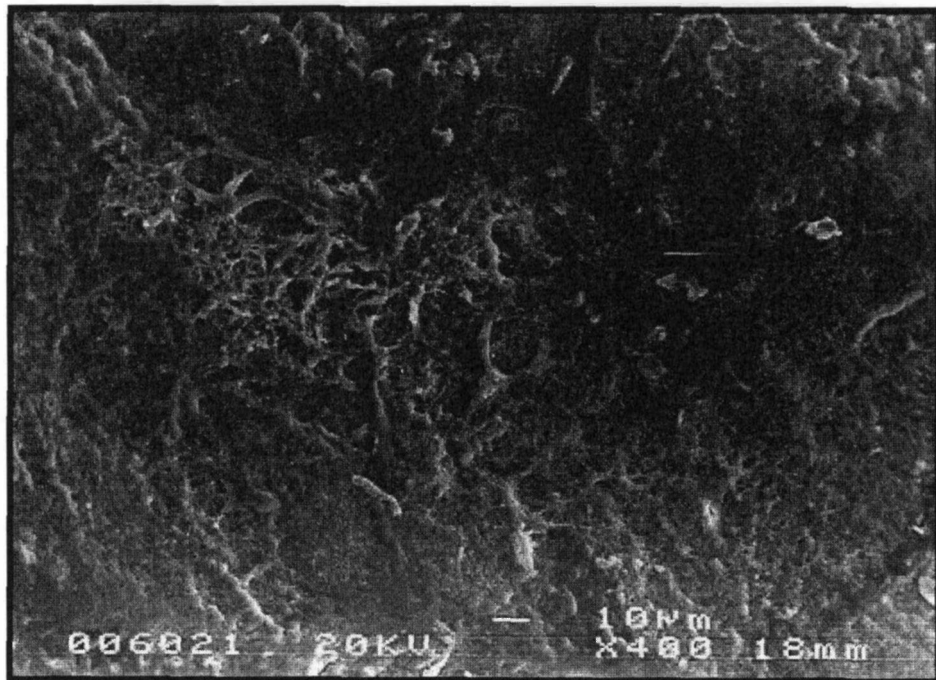


Figura 18: adesão celular na superfície radicular do grupo irradiado com Nd: YAG com pulso curto

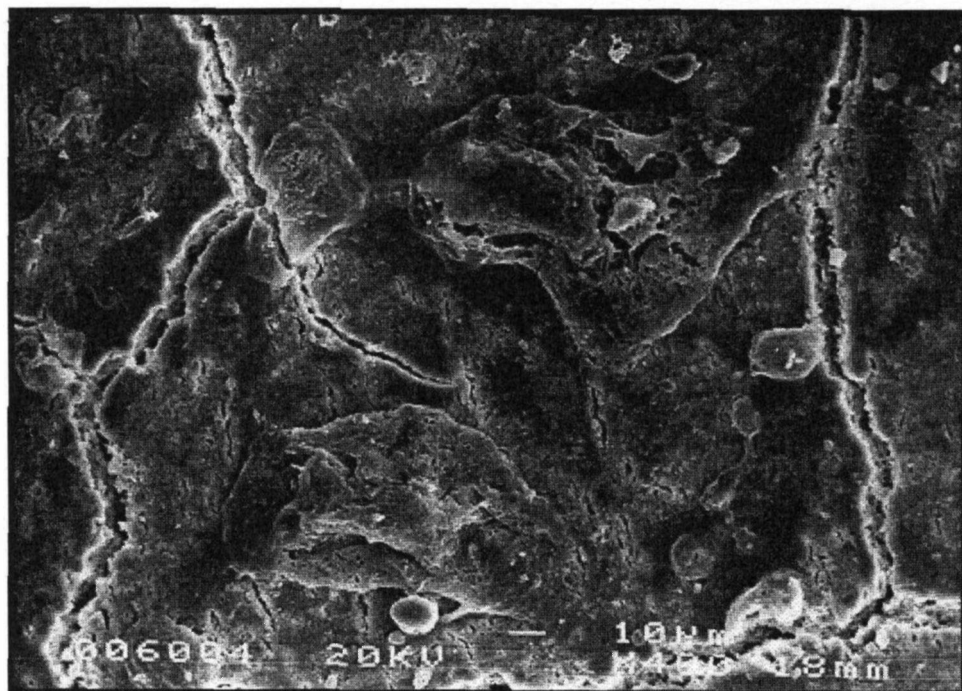


Figura 19: adesão celular na superfície radicular do grupo irradiado com Nd: YAG com pulso longo

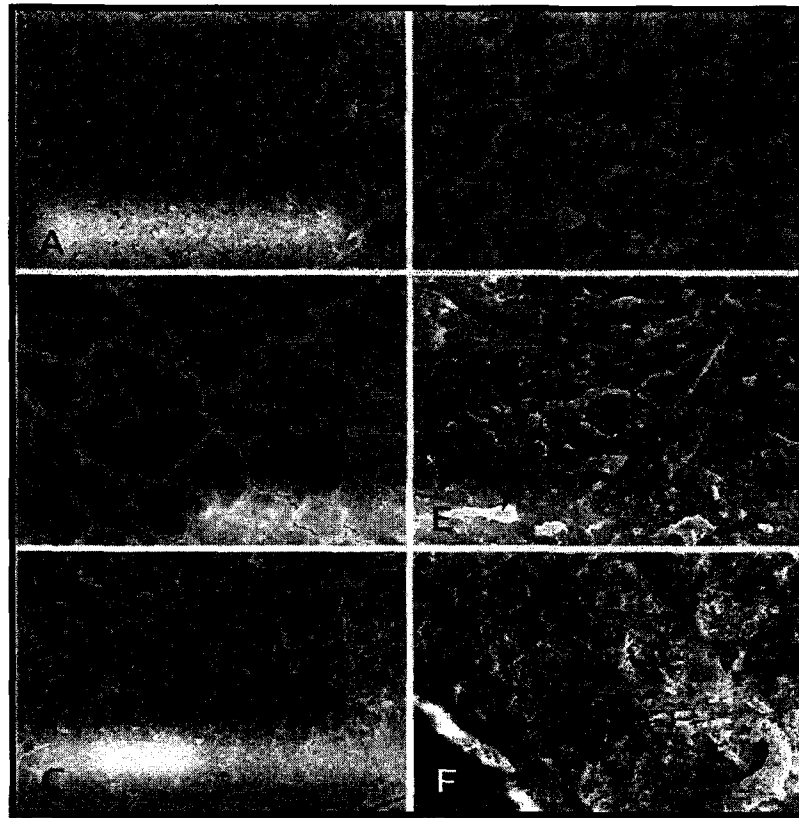


Figura 20A: Grupo controle sem células

Figura 20B: Grupo irradiado com Nd: YAG com pulso curto sem células

Figura 20C: Grupo irradiado com Nd: YAG com pulso longo sem células

Figura 20D: Grupo controle com células

Figura 20E e F: Grupo irradiado com Nd: YAG com pulso curto com células.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Em todas as superfícies foi possível observar células aderidas, em graus variados, portanto todas biocompatíveis.

O fato de ter sido mais fácil encontrar células na superfície tratada com laser de Nd:YAG com pulso longo, usado nestes parâmetros, é um indício de que o mesmo deixa uma superfície mais biocompatível, provavelmente devido ao tipo de irregularidades deixadas nesta superfície, que são rugosidades moderadas e a limpeza da superfície, o que facilita a adesão de células. Devido ao pequeno número de amostras e pequeno número de células, optou-se em não fazer análise estatística.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEO, J. J.; DE RENZIS, F. A.; FARBER, P. A. *In vitro* attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. J Periodontol, Chicago, v. 46, n. 11, p. 639-645, Nov.1975.
- ALMEIDA-LOPES et al.; Comparison of the Low Level Laser Therapy Effects on cultured human gingival Fibroblasts Proliferation Using Different Irradiance and Same Fluence.Lasers in Surgery and Medicine. 29:179-184,2001
- ANDO, Y.; AOKI, A.; WATANABE, H.; ISHIKAWA I. Bactericidal effect of Erbium YAG laser on periodontopathic bacteria. Lasers Surg. Med., v. 19, p. 190-200, 1996.
- BABAY, N. Attachment of human gingival fibroblasts to periodontally involved root surface following scaling and/or etching procedures: ascaning electron microscopy study.Braz Dent J, Ribeirão Preto, v. 12, n. 1, p. 17-21, 2001.
- BARALDI, CARLOS EDUARDO e PURICELLI EDELA, Estudos *In Vitro*:Das alterações morfológicas da superfície de raízes submetidas á apicetomia e irradiadas com laser de Nd:YAG.Dissertação de Mestrado em Clínicas Odontológicas- Cirurgia e traumatologia Buço-Maxilo-Facial.
- BRUGNERA JR., A. & PINHEIRO, A. L. B. LASERS na Odontologia Moderna. 2.ed. São Paulo: Pancast, 1998. 356 p.
- CARRANZA, FERMIN A. Periodontia Clínica de Glickman. 5.ed. Rio de Janeiro:Interamericana, 1983. p. 173-185, 186-211, 290-319, 340-367, 651-681.
- CHAN, Y.; CHIEN, R. Bactericidal action of Nd:YAG laser radiation in periodontal pockets. The 4th Int. Congress Laser Dentistry. Bologna: Monduzzi Editore, 1994. p. 185-190.

- COBB, C. M; McCAWLEY, T. K; KILLOY, W. J. A preliminary study on the effects of the Nd:YAG laser on root surfaces and subgingival microflora in vivo. J. Periodontol., v. 63, n.8, p. 701-707, Aug. 1992.
- COGEN, R. B.; AL-JOBURI, W.; GANTT, D. G.; DENYS, F. R. Effect of various root surface treatments on the attachment and growth of human gingival fibroblasts: histologic and scanning electron microscopic evaluation. J Clin Periodontol, Copenhagen, v.11, p.531-539, 1984.
- COLUZZI, D. J.; RAFETTO, N. Clinical Case Study. Laser curettage as adjunctive treatment of moderate periodontal disease. Wavelengths. Official Publication of the Academy of Laser Dentistry, v. 5, Issue 3, p. 4, 1997.
- DOBSON, J., WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. Archs Oral Biol. Great Britain, v. 37, n. 11, p. 883-887, June 1992.
- FERNYHOUGH, W.; PAGE, R. C. Attachment, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin-treated normal and diseased tooth roots. J Periodontol, Chicago, v. 54, n. 2, p. 133-140, 1983.
- FULLER, T. A. Physical considerations of surgical laser. In: CLAYMAN, L.; KUO, P. Lasers in Maxillofacial Surgery in Dentistry. New York: Thieme Medical Publishes, 1997, cap. 1, p 1-10.
- FRÓIO, G. L. et al. Laser de Nd:YAG na redução bacteriana periodontal: estado atual da questão. Periodontia, v.13, n. 5, p. 30-35, mar. 2002.
- ISRAEL, M.; COBB, C. M.; ROSSMANN, J. A.; SPENCER, P. The effects of CO₂, Nd:YAG and Er:YAG lasers with and without surface coolant on tooth root surfaces. An *in vitro* study. J Clin Periodontol, Copenhagen, v. 24, n. 9, p. 595-602, Sept. 1997.

- LIN, P. P.; LADNER, J. R. et al. The effect of a pulsed Nd:YAG laser on periodontally-diseased root surfaces: A SEM study. Dent. Res. V. 71, (I.A.D.R. Abstracts) p. 299, 1992a.
- LIU, H-C.; LIN, C. P.; LAN, W. H. Sealing depth of Nd:YAG laser on human dentinal tubules. Journal of endodontics, v. 23, n. 11, p. 691-693, Nov. 1997.
- RADVAR, M.; MacFARLANE, T. W. An evaluation of the Nd:YAG laser in periodontal pocket therapy. Brit. Den. J. V. 180, n.2, p. 57-62, Jan. 1996.
- LOPES, I. M. L.; EDUARDO, C.P. Laserterapia em Periodontia. In: LASCALA & MOUSSALI, Compêndio Terapêutico Periodontal. São Paulo: Artes Médicas 3^a. ed., p.293-307, 1999.
- LÖE, H.; THEILADE, E.; JESSEN, S. B. Experimental gingivitis in man. J. Periodontol., v. 36, n. 3, p. 177 – 187, May/Jun, 1965.
- MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in rubi. Nature, v. 187, p. 493-494, aug. 1960.
- MALDONADO, E. P.; Mecanismos de interação Laser- Tecido; março 2000.
- MELLO, J.B; MELLO, G. P. S. Laser em odontologia. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2001, p. 174.
- MORITZ, A. at al; Treatment of periodontal pockets with a diode laser. Laser Surg Med., v.22, p.203-211, 1998.
- MORLOCK, B. J.; PIPPIN, D. J. et al. The effect of Nd:YAG laser exposure on root surfaces when used as an adjunct to root planning: an in vitro study. J. Periodontol., v. 63, n. 7, p. 637-641, Jul. 1992.
- MOZAMMAL et al. Effect to Pulsed Nd:YAG Laser Irradiation on Acid Demineralization of Enamel and Dentin, Journal of clinical laser medicine & Surgery, v. 19, n 2, 2001.

- PRICHARD, J. F.; *Enfermedad periodontal avanzada: tratamiento quirúrgico y protésico*. 3.ed. Barcelona:Talleres Gráficos Ibero Americanos,1977.
- RADVAR, M.;CREANOR, S. L. et. al. An evaluation of the effects of an Nd:YAG laser on subgingival calculus, dentine and cementum. *J. Clin. Perio.* n. 2, p. 71-77, 1995.
- RADVAR, M.;MacFARLANE, T. W. An evaluation of the Nd:YAG laser in periodontal pocket therapy. *Brit Den. J.* v. 51, n. 2 p. 57-62, Jan. 1996.
- STERN, R. H.; SOGNAES, R. F. Laser beam effect on dental hard tissues. *J. Dent.rest.*, v.43, n.5, p. 873, 1964.
- SANKAR, S., WILSON, M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J. Periodont. Res. Denmark*, v. 28, p. 204-210, 1993.
- SCHAWLOW, L.; TOWNES, C. H. Infrared and optical masers. *Phys. Rev.*,v. 112,n. 6, p. 1940-1949, Dec. 1958.
- SOCRANSKY, S. S. & HAFFAJEE A. D. Microbiologia da Doença Periodontal. In: LINDHE, J. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, cap. 4, p. 92-126.
- STRAHAN, J D.; WAITE, I. M. Etiologia e patologia da doença periodontal. In: __ Atlas colorido de Periodontologia. São Paulo: Manole, 1998. cap. 2 – 4, p. 15 – 29.
- TERRANOVA, V.P.; MARTIN, G. R. Molecular factors determining gingival tissue interaction with tooth structure. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v. 17, n. 5, p. 530-533, Sept., 1982.
- TEWFIK, H. M.; GARNICK, J. J.; SCHUSTER, G. S.; SHARAWY, M. M. Structural and functional changes of cementum surface following exposure to e modified Nd:YAG laser. *J periodontol*, Chicago, v. 65, n. 4, p. 297-302, Apr. 1994.

- TRYLOVICH, D. J.; COBB, C. M.; PIPPIN, D. J.; SPENCER, P.; KILLOY, W. J. The effects of the Nd:YAG laser *in vitro* fibroblast attachment to endotoxi-treated root surfaces. J Periodontol, Chicago, v. 63, n. 7, p. 626-632, July. 1992.
- TSENG, P. et al. The bactericidal effect of a Nd:YAG laser in vitro. J. Dent. Res., v. 70, n. 4, p. 650, April 1991.
- TSENG, P.; LIEW, V. The Bactericidal effect of Nd:YAG Laser: Preliminary *in vitro* studies. Periodontol., v.13, n. 1, p. 20-25, 1992.
- WILDER-SMITH, P. Et al. Effect of Nd:YAG Laser Irradiation and Root Planing on the Root Surface: Structural and Thermal Effects. J. Periodontol., v. 66, n. 12, p. 1032-1039, 1995.
- WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. J. Applied Bacteriol., London, v. 75, p. 299-306, 1993.
- WILSON, M.; DOBSON, J. Lethal photosensitization of oral anaerobic bacteria. Clin. Infect. Diseases. Chicago, v. 16, p. S414- S415, 1993. Suppl 4.
- WILSON, MICHAEL. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. Internat. Dent. J., London, v. 44, n. 2, p. 181-189, 1994.
- WHITE, J. M.; FAGAN, M. C.; GOODIS, H. E. Intrapulpal temperatures during pulsed Nd:YAG laser treatment of dentin, in vitro. Journal of Periodontology, v.65, n.1-3, p. 255-259, Oct. 1994.
- YONAGA, K.; KIMURA, Y.; MATSUMOTO, K. Treatment of cervical dentin hypersensitivity by various methods using pulsed Nd:YAG laser. Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery, v. 17, n.5, p. 205-210, 1999.