

ESTUDO *IN VIVO* DA ESTRUTURA DENTAL IRRADIADA COM LASER DE HOLMIUM

Patrícia Lerro de Paula Eduardo², Cláudia Strefezza¹, Claudia Bianchi Zamataro¹, Carolina Benetti¹, Vera Lúcia Ribeiro Salvador², Carlos de Paula Eduardo², Wagner de Rossi¹, Luciano Bachmann³, Denise Maria Zezell¹

1 - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN - CNEN/ SP – Brasil
Av. Lineu Prestes 2242 - Cidade Universitária - CEP: 05508-000 - São Paulo - SP BRASIL

2 - FOU SP - Faculdade de Odontologia da USP – Brasil

3 - Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto – Brasil

E-mail: zezell@usp.br

RESUMO

A irradiação laser pode aumentar a resistência dental aos ácidos, diminuindo sua desmineralização. Amostras obtidas a partir de dentes bovinos foram submetidas a aplicações tópicas de produtos fluoretados e divididas em dois grupos: um não irradiado, e outro nos quais tratamento fluoretado foi combinado com diferentes fluências de irradiação de um protótipo de laser Ho:YLF ($\lambda = 2,065\mu\text{m}$). Exceto pelo grupo controle, todas as amostras de esmalte foram submetidas a ciclagem, sendo expostas ao tratamento fluoretado seguido por desmineralização. As amostras foram analisadas por EDS e microscopia eletrônica de varredura. No primeiro experimento *in vitro*, espectrometria de fluorescência de raio-X mostrou que o conteúdo de Ca/P não variou antes e após a irradiação com laser Ho:YLF. Entretanto, este conteúdo de Ca/P foi significativamente diferente do grupo controle para os grupos irradiados. Estes resultados indicam que a irradiação com o laser Ho:YLF, quando combinada com tratamento fluoretado de alta concentração de fluor é uma alternativa promissora para a prevenção clínica da doença carie

Descritores: Estruturas dentais, laser Ho:YLF, desmineralização

ABSTRACT

Laser irradiation can increase dental resistance to acid, decreasing its demineralization. Samples obtained from bovine teeth were submitted to topical fluoride treatment and divided into four groups: a non-irradiated group, and other in which the fluoridated treatment were combined with different fluencies of an Ho:YLF laser prototype developed at IPEN ($\lambda = 2,065\mu\text{m}$). Except for the control group, all enamel samples were submitted during 24 hours to fluoride treatment followed by demineralization. Samples were analyzed by EDS and scanning electron microscopy. At the first *in vitro* experiment, X-ray fluorescence spectrometry showed that the Ca/P contents does not vary before and after Ho:YLF irradiation. However this Ca/P content was significantly different from the control group to irradiated groups. These results indicates that Ho:YLF irradiation combined with high concentration fluoride treatment is a promising alternative to clinical caries prevention

Key words: dental structures, laser Ho:YLF, demineralization

INTRODUÇÃO

As características únicas da luz laser despertaram um grande interesse nas áreas médicas, tanto para diagnósticos bem como para terapias, e é inegável sua importância também na pesquisa e uso clínico odontológico. Dados da literatura mostram que a superfície dental tem sua resistência a dissolução ácida aumentada quando irradiada com laser [1], diminuindo sua desmineralização durante os ciclos de pH. A irradiação laser também pode aumentar a retenção de flúor na superfície do esmalte dental (ou dentina) ou ainda causar a fusão do esmalte seguida por solidificação aumentando a micro dureza superficial do esmalte [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]. Estas mudanças físicas e químicas em uma superfície dental podem contribuir para a diminuição dos índices da doença cárie.

Cárie é uma doença infectocontagiosa, multifatorial, sacarose dependente e, provavelmente, a doença bacteriana mais prevalente [9]. Os microrganismos cariogênicos, transmitidos verticalmente através da saliva no ambiente familiar durante a primeira infância, colonizam a cavidade bucal. Dentre estes microrganismos os *Streptococcus mutans* são considerados os mais cariogênicos. Assim, a doença cárie está associada a quatro principais fatores etiológicos: um biofilme potencialmente cariogênico formado principalmente por microrganismos acidogênicos, hospedeiro (dentes), dieta rica em sacarose e tempo.

As estratégias de prevenção almejam aumentar a resistência da superfície dos elementos dentais do hospedeiro aos ácidos produzidos pelos microrganismos do biofilme dental. Estes ácidos são provenientes da metabolização de carboidratos fermentáveis, principalmente a sacarose, presentes na dieta do hospedeiro. Fatores secundários tais como higiene oral, presença de fluoreto tópico, capacidade tampão da saliva e dieta controlada podem modular a atividade da doença cárie. A irradiação laser parece diminuir a solubilidade dental em ambiente ácido.

O laser de holmium ($\lambda = 2.065 \mu\text{m}$) é bem absorvido pela água e hidroxiapatita os quais são os principais componentes

estruturais do esmalte dental que é considerado é o tecido mais mineralizado constituído por 96% de cristais de hidroxiapatita e apenas 4% de água e outros materiais orgânicos.

As mudanças físicas e químicas na superfície dental irradiada com o laser de Holmio parecem ser promissoras desde que estudos prévios do "Centro de Lasers e Aplicações (IPEN- Brazil)" demonstraram que este laser pode ser usado na prevenção da cárie em função da vaporização de componentes orgânicos do esmalte dental, aumento da microdureza de superfície, aumento da resistência a desmineralização ácida, e menor perda de cálcio iônico quando comparada ao grupo controle não irradiado [9, 10, 11].

Recentemente, o desenvolvimento de laser com cristais dopados com íons de terras raras emissores próximo ao infravermelho atraíram atenção considerável pelas suas aplicações em diversas áreas, em particular o laser de Ho^{3+} de $2,1 \mu\text{m}$, que apresenta aplicações potenciais em ótica, comunicações, processos industriais e medicina. Um protótipo do laser de holmium foi desenvolvido pelo "Centro de Lasers e Aplicações (IPEN- CNEN/SP, Brasil)" em 1993 para realização de estudos biomédicos, principalmente na área odontológica, por causa das suas características tais como foco de pequena área e alta densidade de energia. O Ho^{3+} tem uma vida média relativamente longa, emitindo no nível 5I7 o qual resulta em uma capacidade de armazenamento de alta energia e operação de chaveador eficiente. A transmissão de radiação no infravermelho médio é possível por meio de fibras de quartzo, as quais são componentes essenciais do laser com várias possibilidades de aplicações.

Os principais objetivos deste trabalho foram: (a) analisar *in vitro* as alterações físicas e químicas na superfície dental irradiada com laser de Hólmio ($\text{Ho:YLF } \lambda = 2,065 \mu\text{m}$) combinada com a aplicação de produtos fluoretados de alta concentração e uso tópico e a sua correlação na prevenção de cáries; (B) analisar *in vivo* as alterações histológicas no tecido pulpar, em decorrência da variação de temperatura.

MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo utilizou um laser com comprimento de onda de 2,064 μm . O meio ativo utilizado foi Er:Tm:Ho:LiYF₄ (YLF), onde Erbium e Thulium atuam como sintetizadores para transferir eficientemente a energia absorvida para um estado metaestável de energia do *Holmium*. Os cristais de alta qualidade de YFL tri dopados com terras raras foram obtidos através de um procedimento sistemático. Uma atmosfera reativa de fluoreto de hidrogênio (HF) gasoso foi utilizada nas fases de síntese e refinamento de preparo do componente. Os cristais foram crescidos pela técnica de Czochralski em uma atmosfera purificada de argônio usando uma estufa convencional de aço inox com resistência de grafite para aquecimento da mesma. A barra do laser, com terminos planos e paralelos (6 X 80 mm), foi posicionada no foco de um espelho elíptico refletor banhado a prata e refrigerado a água, com uma lâmpada de xenônio no outro ponto focal. O ressonador do laser consiste em um espelho posterior e um espelho frontal com R entre 65 a 99%. Assim, o laser atinge a máxima energia 1,7 J e largura de pulso de 400 μs permitindo o fácil acoplamento de uma fibra ótica para as aplicações médicas ou odontológicas.

Em um primeiro estudo *in vitro*, foram realizados simultaneamente dois protocolos distintos divididos em duas fases. Na primeira fase, 20 amostras de esmalte obtidas de dentes bovinos foram polidas, conforme descrito na literatura, e submetidas a tratamento tópico fluoretado por 24 horas, a um tratamento fluoretado com NaF 2%; 0,68 M H₃PO₄; pH 5,3 e lavadas com água destilada e deionizada. Em seguida, as amostras foram aleatorizadas entre quatro grupos de cinco amostras: um grupo controle não irradiado, e outros três grupos nos quais o tratamento fluoretado foi combinado com diferentes fluências de irradiação com o laser de hólmio (Tabela 1). Por fim as amostras foram submetidas a desmineralização, realizada através da imersão, durante 6 horas, em ácido láctico 0,1 mol/L; pH 4,8 e em seguida lavadas com água destilada e deionizada por 10 minutos.

Tabela 1- Tratamento das amostras *in vitro* (primeira fase)

Grupo	Fluência Ho:YLF (J/cm ²)
1	0
2	100
3	350
4	450

As amostras foram analisadas por espectrometria de fluorescência de raio-X e microscopia eletrônica de varredura. Esta fase teve como objetivo inicial analisar as mudanças físicas e químicas na superfície dental irradiada com o laser de hólmio quando combinada com tratamento tópico fluoretado de alta concentração e sua correlação no aumento de resistência a desmineralização.

A segunda fase do experimento *in vitro* teve como objetivo analisar as variações de temperatura durante a irradiação, para estabelecer um parâmetro de irradiação no experimento *in vivo*. Um total de 20 dentes de coelhos e 10 pré-molares humanos foi dividido em dois grupos mistos contendo 10 dentes de coelhos e cinco dentes humanos cada. Cada amostra teve um termopar acoplado no interior da câmara pulpar para verificar as variações de temperatura, e foi submersa em um banho térmico para simular a temperatura corpórea. Foi realizada as irradiações com laser Ho:YLF laser ($\lambda=2,065 \mu\text{m}$) perpendicularmente a um ponto da amostra. O Grupo 1 foi submetido a irradiação com uma fluência de 350 J/cm² e Grupo 2 foi submetido a irradiação com uma fluência de 450 J/cm² ou mais (450 J/cm² a 512 J/cm²). Nesta etapa do experimento um sistema de entrega utilizado foi uma fibra ótica com 365 μm de diâmetro (LER-3M-USA) que permitiu uma aplicação pontual do laser.

No experimento *in vivo*, utilizou-se 10 coelhos machos adultos com peso corpóreo similar. Foi realizada a irradiação com laser Ho:YLF ($\lambda=2,065 \mu\text{m}$; 10 pulsos; 0,5 Hz) no arco superior dos animais, em dentes alternados para manter um controle intra grupo. Os animais foram aleatorizados entre dois grupos (A e B) nos quais cada lado da mandíbula foi irradiado com uma densidade de energia: 300 J/cm² no lado direito e 450 J/cm² ou acima no lado esquerdo

Após a irradiação, foram obtidas amostras histológicas imediatamente após a

irradiação ($t = 0$) e após 6, 24 e 72 horas para análise histopatológica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira fase do estudo *in vitro*, a espectrometria de fluorescência de raios-X mostrou que o conteúdo de Ca/P foi significativamente diferente do grupo controle quando comparado aos grupos irradiados com laser Ho:YLF laser ($\lambda = 2,065 \mu\text{m}$) com diferentes fluências de energia (100 J/cm^2 , 350 J/cm^2 , 450 J/cm^2). Os resultados obtidos confirmaram a tendência de menor perda mineral nos grupos onde a irradiação foi combinada com tratamento fluoretado de alta concentração. Eles corroboram com estudos anteriores, que mostram que a fusão do esmalte aumenta a microdureza da superfície, sugerindo que o esmalte se torne mais resistente a ação dos ácidos.

A análise por Microscopia Eletrônica de Varredura mostrou que as alterações de superfície relativas a prevenção de cárie ocorreram em dentina. A superfície irradiada de esmalte mostrou uma fusão uniforme para o comprimento de onda utilizado. Para os grupos irradiados (2, 3 e 4) as imagens mostraram menor perda mineral quando comparado ao grupo controle. Esta alteração na superfície, combinada com a perda de água e a redução de conteúdo orgânico talvez justifiquem a menor perda mineral quando os grupos irradiados foram comparados ao grupo controle.

Na segunda fase do estudo *in vitro*, foi verificada uma variação térmica de $1 \text{ }^\circ\text{C}$ a $4,5 \text{ }^\circ\text{C}$ para as densidades de energia de 350 J/cm^2 e 450 J/cm^2 (ou acima), respectivamente. O aumento de temperatura máxima foi de $3,8 \text{ }^\circ\text{C}$ para a densidade de energia de 350 J/cm^2 e $4,2 \text{ }^\circ\text{C}$ para a densidade de energia de 450 J/cm^2 (ou acima) durante a irradiação com laser Ho:YLF ($\lambda = 2,065 \mu\text{m}$), tanto para amostras de dentes humanos como para dentes de animais.

No experimento *in vivo*, observou-se que a variação térmica no tempo imediatamente após a irradiação ($t=0$) não causou infiltrado de células inflamatórias no tecido pulpar para o grupo controle. Para todas as densidades de energia, tanto o grupo A quanto o grupo B nos tempos 6, 24 e 72 horas não houve infiltrado de células

inflamatórias no tecido pulpar após a irradiação com laser Ho:YLF ($\lambda = 2,065 \mu\text{m}$).

A monitoração da variação térmica é fundamental para propósitos clínicos sugeridos para o laser de Ho. Os resultados encontrados mostram que esta variação após a irradiação com laser Ho:YLF ($\lambda = 2,065 \mu\text{m}$) é compatível com o uso clínico uma vez que a variação de temperatura aferida encontra-se dentro da faixa do biologicamente aceitável.

A análise histológica após a irradiação das amostras mostrou que o aumento da temperatura no interior da câmara pulpar não levou a achados histológicos que pudessem sugerir alterações celulares.

CONCLUSÃO

Foi observada uma menor desmineralização e maior resistência a ação de ácidos da superfície de esmalte submetida a combinação de irradiação de laser Ho:YLF ($\lambda = 2,065 \mu\text{m}$) com o tratamento fluoretado de alta concentração, quando comparado ao grupo controle.

A fusão da superfície de esmalte irradiada com o laser de Ho:YLF ($\lambda = 2,065 \mu\text{m}$), verificada pela microscopia eletrônica de varredura, mostrou que a irradiação com laser Ho:YLF ($\lambda = 2,065 \mu\text{m}$) combinada com altas concentrações de fluoreto aumenta a resistência aos ácidos.

As variações térmicas observadas no experimento *in vivo* não causariam danos clínicos, de acordo com a literatura.

Os resultados indicam que a irradiação de laser Ho:YLF ($\lambda = 2,065 \mu\text{m}$) combinada com tratamento fluoretado de alta concentração é uma alternativa promissora para a prevenção clínica de cáries.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro das agências de fomento: FAPESP - CEPID (05/51689-2) e CNPq - Instituto Nacional de Fotônica – INFO/CNPq (573916/2008-0).

REFERÊNCIAS

[1] SOGNAES, R. F.; STERN, R. H. Laser effect on resistance of human dental enamel to demineralization in Vitro. J. South Calif.

State Dent. Assoc., v. 33, n. 8, p.328-329, aug.1965.

[2] EDUARDO, C.P.; ZECELL, D. M.; CECCHINI, S.C. M.; ROSSI, W; RANIERI, I.M.; MORATO,S. P. ; MATSUMOTO, K. Proceedings of 4th International Congress on Lasers in Dentistry, Singapore, p.6-10, aug, 1994.

[3] LIPPAS, M. G.; ARCORIA, C. J.; KHADEMI, J. A. Proceedings Of International Society for Lasers in Dentistry-ISLD, p.139-40, 1992.

[4] ZECELL, D. M.; BONK, P. A.; SALVADOR, V.L.R.; VIEIRA JR, N. D.; EDUARDO, C. P. Proceedings of 6th International Congress on Laser in Dentistry, p.63-65, Hawaii, USA, July 28-30, 1998.

[5] FEATHERSTONE, J. D. B.; BARRET-VESPONI, N. A.; FRIED, D.; KANTAROWTZ, Z.; SIKI, W. Journal of Dental Research, vol 7(6), pp1397-1403, 1996.

[6] FEATHERSTONE, J. D. B.; FRIED, D.; BITTEN, E. R. Proceedings of International Symposium on Biomedical Optics SPIE, vol 2373, pp 112-6, Bellingham, 1997.

[7] CECCHINI, S.C. M. Masters Degree Thesis IPEN CNEN SP Brazil, 1995.

[8] MYAKI, S. I.; Masters Degree Thesis Faculty of Dentistry USP SP Brazil, 1995.
8 CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) Guideles for School Health Programs. MMWR, 1996, 45 No RR – G p.4.

[9] EDUARDO, C.P.; ZECELL, D. M.; CECCHINI, S.C.M.; DE ROSSI, W.; RANIERI, I.M.; MORATO, S.P.; MATSUMOTO, K. Scanning electron microscopy analysis of enamel and dentin irradiated by holmium laser. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY. 4. Singapore, Aug. 6-10, 1994. Abstracts of papers. Singapore, s.n., 1994. p. 35.

[10] ZECELL, D.M.; CECCHINI, S.C.M.; EDUARDO, C.P.; MATSUMOTO, K.; De ROSSI, W.; NOGUEIRA, G.E.C.; BERRETTA, J.R.; VIEIRA, Jr., N.D.; MORATO, S.P.

Experimental studies of the applications of holmium laser in dentistry. J. Clin. Laser Med. Surg, v..13, n..4, p..283-9, 1995.

[11] BONK, P.A. Avaliação da mudança da microdureza na superfície de esmalte dentário irradiada com laser de hólmio e modelamento das microexplosões. 1999. Dissertação (Mestrado) - IPEN/USP.