



Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO DA REDUÇÃO MICROBIANA INTRACANAL UTILIZANDO
LASER DE BAIXA POTÊNCIA ASSOCIADO A
FOTOSENSIBILIZADOR E LASER DE ALTA POTÊNCIA**

ELENI CRISTINA KAIRALLA

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

Orientador:
Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques

Co-orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

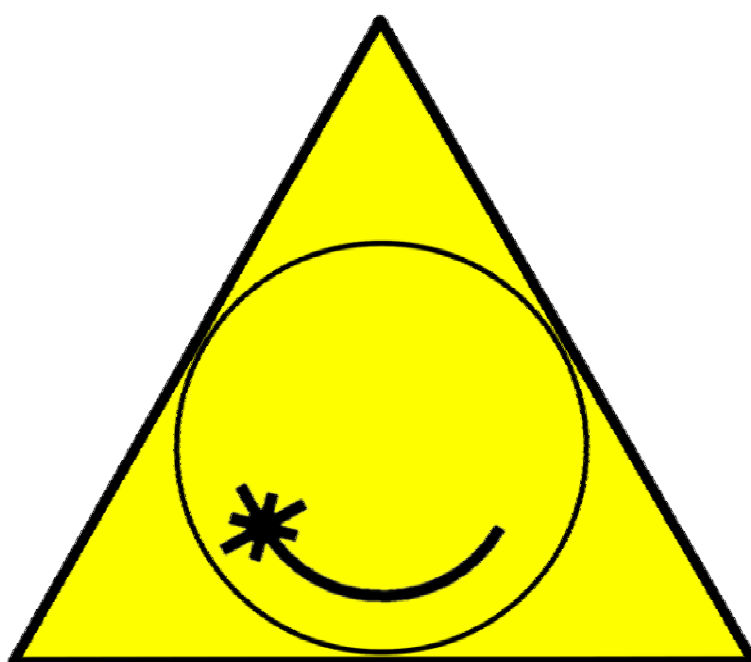
São Paulo
2006



Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo

MESTRADO PROFISSIONALIZANTE

LASER EM ODONTOLOGIA



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**ESTUDO DA REDUÇÃO MICROBIANA INTRACANAL UTILIZANDO
LASER DE BAIXA POTÊNCIA ASSOCIADO A
FOTOSENSIBILIZADOR E LASER DE ALTA POTÊNCIA**

ELENI CRISTINA KAIRALLA

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

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques
Co-orientadora: Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

São Paulo

2006

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Nilton e Gleide**
pelo amor, pela formação e apoio constantes

Às minhas irmãs e “irmãos”
Marcia e Ana , Júnior e Marco
pela amizade e incentivo sempre presentes

e

Rodrigo, Vinícius e Fernando
pela alegria e amor compartilhados

Por juntos vivermos a plenitude de uma família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. **José Luiz Lage-Marques** pela amizade sempre demonstrada, incentivo e ensinamentos - estímulo constante no caminhar pela busca do saber.

Obrigada, sempre.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **Martha Simões Ribeiro** pela co-orientação e valiosa contribuição a este trabalho.

Ao Prof. Dr. **Guilherme Ary Plonsk**, pelo incentivo e apoio a minha formação de pesquisadora.

À **DMC equipamentos odontológicos** pelo apoio na realização deste projeto.

Ao **Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo – IPT**, pela disponibilidade de seus laboratórios à realização dos ensaios deste estudo.

Aos **Professores e colegas** do Curso de Mestrado pelos conhecimentos transmitidos e compartilhados e pela convivência proveitosa.

Ao **Thomas Rose, Olga Yoshida, Waldyr Cortez, Malu, João Carlos, Denise, Luiz Francisco**, incentivadores na realização de pesquisas e desenvolvimento tecnológico.

A Dra. **Filomena** pelos ensinamentos e dedicação.

Ao Dr. **David**, colega e amigo.

A **Tânia e Silvio**, companheiros durante curso; amigos para a vida.

Ao **Ronaldo**, pela convivência, crescimento e amizade que, com muita paciência, sempre esteve disposto a ouvir e aconselhar.

Aos técnicos dos laboratórios do IPT: **Antônio, Aelson, Alice** e a auxiliar **Beth** (biotecnologia), e **Jonas** (microscopia eletrônica), com os quais a troca de experiências e aprendizado foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À **Marina** e **Letícia** pela gravação das imagens durante os ensaios no laboratório.

Às secretárias **Elza, Andréa** (IPEN), **Elvira, Emília** e **Graça** (IPT) pela eficiência profissional e principalmente pelo carinho e o apoio da **Lili, Jô** e **Haroldo** (LELO).

Obrigada.

ESTUDO DA REDUÇÃO MICROBIANA INTRACANAL UTILIZANDO LASER DE BAIXA POTÊNCIA ASSOCIADO A FOTOSSENSIBILIZADOR E LASER DE ALTA POTÊNCIA

Eleni Cristina Kairalla

RESUMO

O alto índice de insucesso do tratamento endodôntico em dentes com polpa necrótica está diretamente relacionado com a infecção intracanal. Nesta situação, o microrganismo predominantemente encontrado é a bactéria *Enterococcus faecalis*. A desinfecção do sistema de canais radiculares com uso dos lasers ocorre por desnaturação da bactéria pelo aumento de temperatura ou pelo efeito da terapia fotodinâmica (PDT), promovendo a morte da célula alvo. Este estudo teve por objetivos comparar a redução bacteriana intracanal utilizando laser de baixa potência associado a fotossensibilizador (PDT) e laser de alta potência, e analisar a morfologia da dentina irradiada. Vinte e oito dentes humanos unirradiculares, sem coroa, foram instrumentados, esterilizados, divididos em dois grupos e contaminados com suspensão de *E. faecalis*. Após 7 dias, os espécimes dos grupos controle (GCI ; GCII) foram preparados para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). No GI (PDT) os espécimes tiveram o canal preenchido com o corante azul de metileno 0,01% e foram irradiados com laser de baixa potência (P=37,7mW). No GII, os espécimes foram irradiados com laser de alta potência (P=2,27W). Imediatamente após a aplicação da irradiação os espécimes (GI e GII) foram preparados para contagem de UFC/mL. A redução microbiana intracanal foi de 91,9% nos espécimes do GI e de 91,6% nos do GII, não apresentando diferença estatística significativa entre os protocolos estudados. Nos espécimes do GII a dentina irradiada apresentou alterações morfológicas na superfície periférica dos túbulos dentinários, sendo observada uma forma arredondada com ângulo atenuado. Alterações morfológicas não foram observadas na superfície da dentina irradiada dos espécimes do GI (PDT).

STUDY OF THE INTRACANAL MICROBIAL REDUCTION USING A LOW-POWER LASER COMBINED WITH A PHOTSENSITIZER AND A HIGH-POWER LASER

Eleni Cristina Kairalla

ABSTRACT

The high rate failure of endodontic treatment of teeth with necrotic pulps is directly related with a intracanal infection. In this situation, the major micro-organism found is the bacterium *Enterococcus faecalis*. The disinfection of the radicular canal system using lasers happens through bacterial denaturation through a raise in temperature or through photodynamic therapy effect (PDT), promoting the death of the targeted cell. These study aimed to compare the intracanal microbial reduction using a low-power laser combined with a photosentitizer (PDT) and a high-power laser and to analyze the morphology of the irradiated dentin. Twenty-eight single-rooted human teeth, without crown, were instrumentated, sterilized, divided in two groups, and inoculated with an *E. faecalis* suspension. After 7 days, 4 samples from each group were prepared for colony forming unit counting (UFC/mL), control group - GCI and GCII, and 10 samples (GI) had the canal filled with a 0.01% methylene blue dye solution and were irradiated with a low-power laser (P=37.7mW); the GII's 10 samples were irradiated with a high-power laser (P=2.27W). Immediately after the application of the irradiation, the samples (GI and GII) were prepared for UFC/mL counting. Both procedures produced intracanal microbial reduction, presenting a 91.9% in the GI and 91.6% in the GII. Not significant statistical differences between the protocols studied. The radiated dentin in the samples of GII presented morphologic changes on the border superfice of dentin tubuli, being observed a rounded form with reduced angle. In the samples radiated with a low-power laser (GI), it wasn't observed any morphologic change.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE ABREVIATURAS	
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	03
3 REVISÃO DA LITERATURA	04
3.1 Endodontia.....	04
3.2 Microbiota intracanal.....	05
3.3 Laser em odontologia.....	10
4 METODOLOGIA	19
4.1 Estudo da propagação da temperatura.....	19
4.2 Estudo microbiológico.....	20
4.2.1 Preparo da suspensão.....	20
4.2.2 Modelo experimental.....	21
4.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	25
5 RESULTADOS	27
5.1 Estudo da propagação da temperatura.....	27
5.2 Estudo microbiológico.....	27
5.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	31
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXO - Parecer de aprovação comitê de ética FOUSP	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção Americana de Tipos de Cultura)
CO ₂	dióxido de carbono (laser com emissão em $\lambda=9.600\text{nm}$ ou 10.600nm)
CRT	comprimento real de trabalho
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA-T	ácido etileno diamino tetra acético e detergente Tergentol
Er:Cr:YSGG	granada de ítrio, escândio e gálio dopada com érbio e cromo (laser com emissão em $\lambda=2.780\text{nm}$)
Er:YAG	granada de ítrio e alumínio dopada com érbio (laser com emissão em $\lambda=2.940\text{nm}$)
FLL	Fotossensibilização Letal por Laser
GaAlAs	arseneto de gálio e alumínio (laser de diodo com emissão em $\lambda = 810\text{nm}$)
He-Ne	hélio- neônio (laser com emissão em $\lambda = 543\text{nm}$)
Ho:YAG	granada de ítrio e alumínio dopada com holmio - (laser com emissão em $\lambda=2.100\text{nm}$)
InGaAsP	arseneto de índio gálio e fósforo (laser de diodo com emissão em $\lambda = 670\text{nm}$)
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)
LILT	Low Intensity Laser Therapy (terapia com laser em baixa intensidade)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NaOCl	hipoclorito de sódio
Nd:YAG	granada de ítrio e alumínio dopada com neodímio (laser com emissão em $\lambda=1.064\text{nm}$)
PDT	Photodynamic Therapy (terapia fotodinâmica)
PQC	Preparo químico cirúrgico

PRP	Paramonoclorofenol + polietilenoglicol 400 + rinossoro
TPI	Tempo de pré-irradiação
TSA	Tryptic Soy Agar – agar de tripicase de soja
TSB	Tryptic Soy Broth – caldo de tripicase de soja
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
Ø	diâmetro

1 INTRODUÇÃO

A Odontologia como Ciência e prática clínica envolve várias áreas, dentre elas, a endodontia, que tem como campo de ação o estudo clínico-patológico das alterações da polpa dental e do periápice, na qual as atitudes de diagnóstico e operacional (cirurgia de acesso, esvaziamento, preparo, desinfecção e obturação) visam propor uma terapia ao sistema de canais radiculares com o objetivo de alcançar o processo de cura, permitindo que o dente retorne às suas funções de mastigação, fonação e estética.

Investigações atuais relatam que o índice de insucesso dos retratamentos, nos casos de polpa necrótica com lesões periapicais, está relacionado com eventuais falhas durante a execução da terapia endodôntica, e principalmente com o não efetivo controle e prevenção da infecção microbiana intracanal.

A própria anatomia do sistema de canais radiculares desfavorece a eliminação desta microbiota devido à presença de canais secundários, canais acessórios, deltas apicais e uma parede interna cuja superfície é formada pela entrada dos túbulos dentinários, o que limita a ação mecânica das limas, a ação química das substâncias auxiliares e favorece o alojamento de microrganismos.

Observa-se também que as características de anaerobiose de algumas bactérias e a alta resistência às substâncias irrigadoras, à medicação intracanal e à medicação sistêmica as tornam capazes de sobreviver mesmo após uma obturação radicular adequada, propiciando o aparecimento de infecções refratárias.

A bactéria *Enterococcus faecalis* é o microrganismo predominantemente encontrado em lesões periapicais refratárias e que apresenta resistência a diversos antimicrobianos empregados no tratamento endodôntico e também a administração sistêmica de alguns antibióticos.

Em vista da dificuldade encontrada na desinfecção de canais, principalmente no terço apical, pelos tratamentos tradicionalmente realizados, justifica-se a procura por métodos mais eficazes.

A tecnologia laser vem, nas últimas décadas, ganhando espaço na área médico-odontológica, não para substituir, mas sim para oferecer alternativas tanto no diagnóstico, na prevenção, quanto na aplicação de protocolos de tratamento.

Na endodontia, o laser tem demonstrado capacidade de eliminação da camada de detritos e de vedação dos túbulos dentinários, vaporização do tecido pulpar, alteração da permeabilidade dentinária e promoção da desinfecção do canal através de uma ação bactericida.

Os lasers de alta potência (Er:YAG, Er,Cr:YSGG, Nd:YAG, Ho:YAG e diodo) são os mais comumente empregados, no entanto, o aumento de temperatura, inerente ao processo, torna o procedimento criterioso devido a possibilidade de causar injúria aos tecidos adjacentes. Já os lasers de diodo de baixa potência requerem uma tecnologia menos complexa além de se apresentarem mais compactos, favorecendo seu uso na prática clínica.

Os lasers produzem luz monocromática, com comprimento de onda definido, o que os torna altamente seletivos a fotossensibilizadores. Quando o corante absorve a energia desta luz produz substâncias altamente reativas, promovendo redução microbiana por causar danos ao microrganismo levando à morte celular. Este mecanismo é conhecido como terapia fotodinâmica (Photodynamic therapy – PDT).

Este estudo propôs-se a avaliar a redução microbiana intracanal, frente à bactéria *E. faecalis*, promovida pela PDT e por um laser de alta potência e analisar a superfície da parede interna do canal radicular após a irradiação.

2 OBJETIVOS

O estudo teve como proposta experimental comparar *in vitro*:

- a redução microbiana obtida pela ação de um laser de diodo de baixa potência empregando a terapia fotodinâmica (fotossensibilizador associado a um laser de baixa potência - PDT) e um laser de diodo de alta potência, em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*.

- a alteração morfológica, em microscopia eletrônica de varredura, da superfície interna do canal após irradiação com laser de alta potência e PDT.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Endodontia

O órgão dentário está diretamente relacionado à ação morfofuncional do sistema mastigatório, uma vez que interage anatômica e fisiologicamente na dinâmica do aparelho digestivo. Desta forma, a presença de inflamação pulpar (pulpite) ou de uma lesão periapical propicia um quadro de disfunção do elemento dentário que a terapia endodôntica visa restabelecer.

Antony Von Leewenhock (1697) foi o primeiro autor a descrever a presença de microrganismos no interior do canal radicular bem como a existência dos túbulos dentinários (*apud*: Leonardo, 1991)

Oguntebi (1994) realizou uma revisão da literatura quanto a infecção dos túbulos dentinários em relação a terapia endodôntica. Ressaltou que os túbulos dentinários possuem um micro-ambiente que favorece o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios, pois agem como reservatório e propiciam a recolonização do canal radicular. Os estudos demonstravam que o preparo químico cirúrgico (PQC) não era efetivo na eliminação da microbiota do sistema de canais radiculares.

Sundqvist *et al.* (1998) relataram que, no tratamento de polpa necrótica em dentes desvitalizados com lesões periapicais e em retratamentos, o índice de sucesso da reintervenção não ultrapassa 74%. Atribuíram esse resultado desfavorável a eventuais falhas durante a execução da terapia endodôntica e ao não efetivo controle e prevenção da infecção microbiana intracanal.

Para Eduardo e Gouw-Soares (2001) a presença de microrganismos no sistema de canais radiculares após a instrumentação está relacionada à

capacidade limitada que o tratamento convencional apresenta em eliminá-los, sendo que a eficiência em removê-los está diretamente relacionada ao acesso e preparo de todas as paredes do canal radicular, o que muitas vezes não é possível diante da complexidade da anatomia dental.

Lana *et al.* (2001) analisaram microbiologicamente 31 dentes portadores de infecção endodôntica, antes e após a instrumentação do canal radicular. Microbiota diversificada foi isolada em 81,7% dos casos, sendo que bactérias anaeróbias estritas estavam em 88,9% das coletas iniciais, desaparecendo após o tratamento instituído. Concluíram que o tratamento endodôntico reduziu a população microbiana intracanal, mas não o suficiente para impedir a recolonização do canal devido à permanência de microrganismos viáveis.

3.2 Microbiota intracanal

Shovelton (1964) estudou a presença e distribuição de microrganismos em dentes não vitais. Observou que de 97 dentes diagnosticados clinicamente como portadores de polpa necrosada, 79 apresentavam microrganismos no interior dos canais radiculares. Concluiu, a partir do histórico clínico e de estudos histológicos, que a invasão bacteriana nos túbulos dentinários era tanto mais severa quanto mais crônico o processo.

Sundqvist (1976) realizou estudo em dentes anteriores íntegros traumatizados que apresentavam polpa mortificada. Dos 32 dentes avaliados radiograficamente, 19 apresentavam lesão periapical. Com o uso de técnicas de anaerobiose para coleta, transporte e cultivo, microrganismos foram isolados em 18 dos 19 dentes, com média de seis espécies por canal, onde 90% eram anaeróbios estritos. Nos 13 dentes que não apresentavam lesão periapical nenhum microrganismo foi isolado.

Haapasalo e Orstavik (1987) constataram que bactérias viáveis podem recolonizar o sistema de canais radiculares mesmo após a realização de um PQC adequado, podendo ocorrer uma invasão eficiente da dentina tubular por *Enterococcus faecalis*.

Em 1990, Nair *et al.* analisaram 9 dentes assintomáticos com lesão periapical persistente e apicectomizados, sob microscopia eletrônica de varredura e eletrônica de transmissão. Em 6 dentes foram detectados fungos e bactérias Gram-positivas na porção apical interna do canal, o que permitiu concluir que microrganismos persistiram a terapia endodôntica e estavam contribuindo para o insucesso do tratamento.

Em 1992, Sundqvist estudou 65 dentes humanos com polpa necrótica e lesão periapical, com o objetivo de caracterizar a microbiota intracanal em razão de sua frequência e associações. Observou contaminação em todos os canais e presença de uma microbiota característica (90% eram bactérias anaeróbias) que apresentavam desenvolvimento de inter-relações entre espécies.

Siqueira Jr. & Uzeda (1996) concluíram que o *E. faecalis* é uma bactéria que apresenta resistência a diversos antimicrobianos empregados no tratamento endodôntico, como o hidróxido de cálcio, o paramonoclorofenol canforado, a clorexidina e o hipoclorito de sódio.

Gomes, Lilley & Drucker (1996) estudaram a susceptibilidade da microbiota intracanal de 42 canais radiculares antes e após a realização do PQC, variando o intervalo de 7 a 10 dias sem uso de medicação intracanal. Observaram a existência de 51 espécies diferentes na coleta inicial e de 40 espécies na segunda coleta, sendo que os anaeróbios estritos foram os mais sensíveis. Observaram um predomínio de Gram-positivos, especialmente o *E. faecalis*. Concluíram que a microbiota intracanal foi susceptível frente ao PQC, porém em diferentes graus, com diferença de resistência entre as cepas.

Em 1997, Siren *et al.* estudaram a ocorrência de bactérias entéricas facultativas em canais infectados em relação aos procedimentos clínicos do tratamento endodôntico. A bactéria mais comumente isolada foi *E. faecalis*, sendo que a maior incidência ocorreu nos casos de reintervenção endodôntica quando em comparação aos casos de tratamento inicial. Os autores concluíram que a realização de tratamento endodôntico com múltiplas sessões, selamento inadequado e situações de reintervenção aumentam a possibilidade de ocorrência de bactérias oportunistas no interior do sistema de canais radiculares.

Sjögren *et al.* (1997) avaliaram a influência da infecção no momento da obturação do canal radicular quanto ao prognóstico do caso. Foram selecionados 55 dentes unirradiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical, com câmara pulpar intacta. Coletas microbiológicas foram realizadas antes da instrumentação dos canais, onde em 100% dos casos havia presença de microrganismos. Após a realização do PQC foram isoladas bactérias em 40% dos casos, dentre elas o *E. faecalis*. Realizado controle clínico radiográfico de 5 anos, observou-se um índice de cura de 94% quando as culturas foram negativas no momento da obturação do canal. Porém, quando as culturas foram positivas nesta mesma etapa, o sucesso só atingiu 68% dos casos. Em razão destes resultados os autores sugeriram que a obturação do canal radicular, em dentes necrosados com presença de lesão periapical, deveria ser realizada após PQC e medicação intracanal antimicrobiana, portanto, em mais de uma sessão.

Murray *et al.* (1998) descreveram o *E. faecalis* como sendo um microrganismo que apresenta capacidade de aderência às células epiteliais do hospedeiro e facilidade de troca através da membrana plasmática. Ao secretar citolisina (proteína que inibe o crescimento de outras bactérias Gram-positivas) favorece sua colonização e promove dano tecidual. Também produz gelatinase que possibilita hidrolisar colágeno, hemoglobina e outros peptídeos pequenos, o que o torna resistente a antibióticos que possuam aminoglicosídeos, beta-lactâmicos e vancomicina.

Peciulienė *et al.* (2000) investigaram a presença de *E. faecalis* em canais radiculares cujos tratamentos endodônticos não obtiveram sucesso. O retratamento realizado em 25 dentes apresentou, nas amostras microbiológicas iniciais, bactérias isoladas em 20 casos, sendo que o *E. faecalis* estava presente em 70% deles. Na coleta realizada após o PQC, bactérias foram isoladas em 7 casos. Relataram que a intervenção endodôntica, por promover o contato de produtos inibidores do metabolismo bacteriano com a microbiota, altera o crescimento bacteriano por limitar o substrato e desta forma interfere drasticamente nas interações bacterianas. No momento da cirurgia de acesso, quando o canal é aberto, ocorre quebra da anaerobiose, eliminando grande parte das cepas bacterianas e do substrato. No entanto, após o selamento, com curativo entre as sessões, a anaerobiose é restabelecida e o influxo do fluido

tecidual propicia um ambiente favorável a recolonização bacteriana. As bactérias anaeróbias sobreviventes proliferam se uma medicação intracanal não for empregada. Concluíram que no desenvolvimento da infecção, onde há um predomínio de bactérias anaeróbias, ocorre estabelecimento de interações susceptíveis ao tratamento instituído, o que significa que o sistema de canais radiculares deveria ser completamente limpo na primeira sessão, onde as bactérias estão particularmente vulneráveis a erradicação por serem sensíveis aos distúrbios de sua própria ecologia. Concluíram também que a bactéria *E. faecalis* foi o microrganismo predominante nos casos de insucesso endodôntico e afirmaram que a eliminação da flora microbiana dos canais radiculares é a chave para o sucesso no tratamento endodôntico das periodontites apicais.

Observa-se também um aumento da resistência microbiana a administração sistêmica de antibióticos. Dahlén *et al.* (2000) testaram a susceptibilidade de cepas de enterococos presentes em amostras de canais radiculares coletados após a realização do PQC e medicação intracanal entre sessões. Foram avaliadas 29 amostras, das quais 79,3% apresentavam cultura pura de enterococos. Relataram que as 26 amostras de *Enterococcus faecalis* e as 3 amostras de *Enterococcus faecium* encontradas foram sensíveis à vancomicina e à eritromicina, porém resistentes aos demais agentes testados. Concluíram que a sensibilidade reduzida dos enterococos a agentes antimicrobianos pode ocasionar sua seleção no interior do sistema de canais radiculares e contribuir significativamente para o insucesso da terapia instituída.

Love (2001) observou que pode haver re-infecção do canal radicular quando células bacterianas viáveis resistem ao PQC, pois estas são capazes de se adaptar ao suplemento de reserva de nutrientes e crescer dentro dos túbulos. Os enterococos, além de possuírem esse fator de virulência (que assegura sua sobrevivência) são ainda capazes de competir com outras espécies bacterianas. Concluiu que o *E. faecalis* é o microrganismo responsável por 90% das infecções enterocócicas humanas sendo dominante e comumente o único a ser recuperado em canais obturados.

Zouain & Araj (2001) relataram que o *E. faecalis* vem se tornando resistente a eritromicina, ampicilina, tetraciclina, clindamicina, metronidazol e benzilpenicilina.

Chávez de Paz *et al.* (2003) estudaram a microbiota resistente ao tratamento endodôntico em dentes que apresentavam periodontite apical. Realizaram acompanhamento microbiológico, durante 10 meses, em 200 dentes em tratamento endodôntico. Após PQC e medicação intracanal antimicrobiana, anaeróbios facultativos Gram-positivos foram detectados, mas bactérias Gram-negativas só foram isoladas em menos de 20% dos casos. A prevalência dos Gram-positivos em relação aos Gram-negativos, segundo os autores, deve-se a estrutura da parede celular, secreções de produtos metabólicos e da resistência medicamentosa adquirida por eles.

Pinheiro *et al.* (2003) avaliaram a presença de microrganismos em 30 dentes com tratamento endodôntico realizado há mais de 4 anos que apresentavam lesão apical. Foram isoladas 55 espécies bacterianas, sendo 80% Gram-positivas e 58% anaeróbios facultativos. *E. faecalis* foi a espécie mais freqüentemente isolada (45,8%) e mostrou-se resistente ao emprego de eritromicina e azitromicina quanto aos testes de susceptibilidade antibiótica. Concluíram que, nos casos de insucesso endodôntico com presença de lesão periapical, a microbiota intracanal é predominantemente Gram-positiva, representada pelo *E. faecalis*.

Ferrari (2005) detectou espécies de enterococos, enterobactérias e leveduras em dentes portadores de infecção endodôntica. Foram estudados microbiologicamente 25 dentes em várias etapas da terapia endodôntica. Antes do PQC foi realizada coleta inicial onde se puderam observar microrganismos em 92% dos canais. Após 7 dias foi realizada nova coleta, observou-se que no grupo em que não foi empregada medicação intracanal houve recolonização em 100% dos casos, sendo 52% representados pelos microrganismos oportunistas e no grupo em que houve emprego de medicação intracanal PRP (paramonoclorofenol, polietilenoglicol 400 e rinossoro) leveduras e entéricos não foram mais detectados, sendo isolados enterococos, (*E. faecalis* e *E. faecium*). Concluiu que os enterococos foram os mais resistentes à terapia instituída.

3.3 Lasers em odontologia

LASER, acrônimo de “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação) caracteriza-se por ser um sistema fundamentado na amplificação da luz. Sua base física está na interação entre os fótons (onda eletromagnética) e os elétrons da camada externa do átomo.

Em 1905, Einstein formulou a hipótese sobre os *quanta* da luz; os postulados de Bohr sobre as transições dos elétrons surgiram em 1913; Gould (1957) estabeleceu as bases teóricas do bombeamento óptico do laser e, em 1961, Maiman obteve efeito com o laser de rubi sendo neste ano a primeira aplicação laser – na área da oftalmologia para realizar uma fotocoagulação (*apud*: Gutknecht & Eduardo, 2004).

Desde então a tecnologia laser vem sendo amplamente estudada e desenvolvida no que se refere à interação da luz com os tecidos, cujos efeitos e aplicações terapêuticas estão diretamente relacionados à energia que os fótons transferem ao tecido alvo durante os processos de absorção / espalhamento.

Diante do desenvolvimento de equipamentos com comprimentos de onda diferentes, diversificou-se a aplicação dos lasers no tecido dental e tecidos adjacentes.

Gutknecht *et al.* (1996a) empregando 40 dentes com canais preparados endodonticamente e infectados com *E. faecalis*, em estudo *in vitro*, obtiveram redução média de 99,91% da população bacteriana após irradiação com laser de Nd:YAG. Sugeriram que o efeito bactericida alcançado neste estudo poderia ser obtido também em casos clínicos. Destacaram que a tecnologia laser é um instrumento cujos efeitos representam um progresso decisivo na eficiência do tratamento conservador.

Gutknecht *et al.* (1996b) preconizaram a técnica de irradiação laser intracanal em movimento helicoidal no sentido ápico-cervical, com velocidade aproximada de 2mm/s, promovendo desta forma uma varredura nas paredes

dentinárias, pois consideraram que a contaminação microbiana está presente em todo o canal.

Moritz *et al.* (1997a) empregando um laser de diodo de 810nm estudaram, *in vitro*, a redução bacteriana em 44 canais radiculares. Os dentes foram preparados, esterilizados, inoculados com *Escherichia coli* e *E. faecalis* e irradiados por 5 vezes durante 5 segundos com o parâmetro de 4W e taxa de pulso de 10ms. Após a aplicação da irradiação laser, nenhum crescimento bacteriano foi observado. Uma avaliação por espectroscópio de infravermelho registrou que o aumento de temperatura na superfície radicular não ultrapassou 6°C, sendo que a irradiação foi realizada em movimentos circulares. Os testes de penetração de corante e o exame de microscopia eletrônica de varredura revelaram completo fechamento dos túbulos dentinários nas paredes irradiadas. Os autores compararam o grau de redução microbiana obtidos neste estudo aos obtidos com laser de Nd:YAG.

Moritz *et al.* (1997b) em estudo *in vivo* com 40 pacientes que apresentavam canais unirradiculares infectados, em associação ao tratamento endodôntico, realizaram irradiação utilizando laser de diodo de 810nm em 4 sessões com os seguintes parâmetros: potência: 2W; frequência: 50Hz; modo: pulsado; entregue por fibra óptica de diâmetro (\varnothing) 400 μ m, em 5 aplicações de 5 segundos com um breve intervalo entre elas. Os resultados foram obtidos por análise microbiológica. Concluíram que, comparando os casos onde houve irradiação com os casos do grupo controle (tratados com a técnica convencional), o laser de diodo de alta potência mostrou um elevado grau de redução bacteriana intracanal.

Lage-Marques & Eduardo (1998) descreveram o laser de diodo de baixa potência GaAlAs como sendo um equipamento prático e de grande valia na clínica endodôntica quando empregado como coadjuvante de técnicas aplicadas com conhecimento e habilidade. Devido à praticidade proporcionada pelo sistema de transmissão e vantagens geradas pela facilidade de aquisição, projeto, baixo custo e obtenção de bons resultados, segundo os autores, é este aparelho o de maior utilização na clínica odontológica.

Radaelli (2002) avaliou a redução bacteriana de *E. faecalis* por meio da irradiação intracanal com laser de diodo ($\lambda = 830\text{nm}$) utilizando potências de 2,5 e 3W, operando em modo contínuo com fibra óptica de $\varnothing = 360\mu\text{m}$, com técnica de aplicação helicoidal ápico-cervical. Concluiu que ambas as potências são parâmetros seguros para utilização intracanal em relação a variação de temperatura que, conforme Eriksson e Albrektsson (1983) demonstraram, aumentos térmicos superiores a 10°C podem provocar danos irreversíveis ao ligamento periodontal, reabsorção externa radicular e anquilose. O grupo irradiado com 3W de potência promoveu 98,5% de redução bacteriana imediatamente após a irradiação, e o grupo irradiado com 2,5W de potência uma redução de 99,2%.

Segundo Lage-Marques (2002) “no transcorrer das últimas décadas os conhecimentos e conceitos vigentes no âmbito da Endodontia vêm sendo repensados e cientificamente reavaliados, possibilitando a instituição de novos procedimentos e nova filosofia de trabalho, buscando terapêuticas que proporcionem níveis mais altos de sucesso”. Neste contexto sugeriu a terapia laser como mais uma alternativa para a obtenção do êxito, onde o laser de baixa potência é empregado como agente controlador da dor pós-operatória e o emprego dos lasers de alta potência como agentes de redução microbiana quando empregados no sistema de canais.

Walsh (2003), em uma revisão sobre o estado da arte das aplicações dos lasers na prática clínica odontológica, descreveu que os equipamentos de baixa potência têm demonstrado eficiência quando empregados no diagnóstico de lesões de cárie e enfatiza a técnica de foto-ativação com potencial para a desinfecção de canais radiculares, bolsas periodontais, preparos cavitários e sítios peri-implantares.

Gutknecht e Eduardo (2004) em uma revisão sobre o uso do laser em Odontologia comentaram que a Endodontia é um campo complexo onde se justifica a busca na obtenção de melhores resultados por meio do emprego de novas tecnologias. Relataram que diversos estudos com diversos lasers que levam a crer que progressos interessantes podem ser obtidos nessa área. Constataram que as maiores experiências em Endodontia devem-se à aplicação do laser de Nd:YAG pulsado. Quanto aos lasers de baixa potência (LILT- Low

Intensity Laser Therapy), dentro do comprimento de onda do laser de hélio-neônio ($\lambda=632,8\text{nm}$) ou do laser de diodo de semicondutores ($\lambda=670$ a 960nm), consideraram o assunto interessante, embora ainda pouco esclarecido.

Os lasers de diodo de baixa potência quando associados a fotossensibilizadores constituem a terapia fotodinâmica (Photodynamic therapy - PDT).

O termo ação fotodinâmica surgiu pela primeira vez em 1900 quando Von Tappeiner & Raab constataram acidentalmente a morte dos microrganismos que estavam sendo cultivados em um meio de cultura contendo acridina diluída e que foram expostos a luz intensa de raios durante uma tempestade. Em 1907, descreveram o tratamento de tumores de pele empregando uma combinação de eosina aplicada topicamente com exposição à luz branca. Postularam que algum produto da fluorescência, e não somente a luz, seria o responsável pela elevada toxicidade (*apud*: Brugnera & Pinheiro, 1998).

Dobson & Wilson (1992), em estudo *in vitro*, estudaram a redução bacteriana de biofilme formado por *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* empregando o laser de He-Ne associado a fotossensibilizador, empregando uma potência de 7,3mW, durante 30s, sobre corantes azul de toluidina, azul de metileno, ftalocinina dissulfonada de alumínio, hematoporfirina HCL e éster de hematoporfirina. Os resultados demonstraram que apenas a associação do laser com os corantes azul de toluidina e azul de metileno foram capazes de eliminar as quatro espécies do biofilme. Concluíram que a técnica da terapia fotodinâmica é capaz de eliminar bactérias periodontopatogênicas do biofilme bacteriano.

Wilson, Dobson & Harvey (1992), variando a concentração de vinte e sete fotossensibilizadores, avaliaram a capacidade de inibição do crescimento bacteriano da *A. actinomycetemcomitans*, *S. sanguis*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis*, quando irradiados com laser de He-Ne de 7,5mW de potência. Concluíram que o azul de metileno, azul de orto-toluidina, cristal violeta, hematoporfirina e éster de hematoporfirina foram efetivos nos tempos variando entre 5 e 60s, com dose de energia entre 2,75 e 33J/cm².

Wilson (1993) afirmou que para que a luz exerça algum efeito sobre uma célula bacteriana deve ocorrer primeiro a absorção desta por um ou mais componentes bacterianos. Quando o comprimento de onda está na faixa visível do espectro, a luz induz a transferência de elétrons para níveis de energia mais altos, formando assim um composto fotossensibilizante em estado excitado (o tripleto). Este irá interagir com o oxigênio molecular, resultando na formação de oxigênio singleto altamente reativo – fotoproceto do Tipo II. Outro fotoproceto - do tipo I, também pode ocorrer. Neste caso, moléculas diferentes do oxigênio agem como receptores de energia e geram radicais hidroxilas ou orgânicos. Seja o fotoproceto do tipo I ou do tipo II, ocorrem reações fotoquímicas cujos produtos promovem lesões em componentes celulares essenciais, por exemplo, no rompimento da membrana citoplasmática ou na alteração de atividades metabólicas, resultando em morte celular. Observou ainda que a maioria das bactérias encontradas na cavidade bucal humana não possui compostos capazes de absorver luz visível suficiente a ponto de serem afetadas por ela. Além do que, a habilidade de um composto absorver luz incidente não necessariamente implica em uma ação fotossensibilizante significativa sobre a viabilidade das bactérias. Ressalta também que o tempo de vida do estado tripleto alcançado deve ter duração suficiente para permitir uma interação com as moléculas adjacentes e desta forma produzir espécies citotóxicas.

Wilson *et al.* (1995) relataram que, com a PDT, a morte da célula bacteriana ocorre mais rapidamente do que quando empregam os agentes antimicrobianos convencionais e, como não há a necessidade da permanência do corante por um período prolongado, como ocorre com os antibióticos, torna o aparecimento de bactérias resistentes menos provável.

Walsh (1997) realizou uma revisão de literatura sobre as aplicações da LILT em tecidos dentários duros. Ao discutir os aspectos técnicos dos equipamentos abordou o emprego dos lasers de alta potência, como de CO₂ e Nd:YAG, reconhecidos quanto ao efeito destrutivo sobre bactérias, mas que, no entanto, são geradores de calor o que torna o procedimento criterioso quanto aos riscos de dano térmico que podem ser induzidos. Relatou também que se um laser de baixa potência for usado conjuntamente a um corante sobre a parede da

célula bacteriana, sua destruição ocorrerá com pequeno ou nenhum risco de dano à polpa ou ao ligamento periodontal devido a baixa energia requerida.

O autor referiu-se a terapia fotodinâmica como fotossensibilização letal por laser (FLL), onde a ação letal à célula alvo se faz pela ativação do corante pela radiação emitida por um laser de baixa potência. Afirmou que esta interação é específica, pois quando o procedimento é realizado somente com o laser (sem corante), somente com o corante ou quando o laser precede a exposição ao corante, o efeito produzido é mínimo. Concluiu que as alterações ocorridas no corante, quando este é exposto à irradiação laser, conduzem a eventos químicos drásticos dentro da célula alvo resultando na perda de sua viabilidade. Baseia-se na interação do cromóforo (agente de absorção óptica) com a luz irradiada, sendo essencial à ressonância entre corante e comprimento de onda, bem como o estudo de ausência de efeitos tóxicos ou irritantes aos tecidos por parte do corante. Relatou que os corantes azuis são conhecidos como potentes sensibilizadores para uma faixa de bactérias quando irradiados por lasers que emitem no espectro do vermelho visível.

Para o autor, a técnica da FLL tem aplicações no tratamento de lesões de cárie dentária e na redução microbiana intracanal e em bolsas periodontais como coadjuvantes às técnicas convencionais, porém, seria necessário desenvolver protocolos clínicos aplicáveis além da melhora dos sistemas de entrega do feixe laser para que o acesso à região em questão fosse efetivo.

Em 1998, Wainwright realizou uma revisão da literatura e relatou que o corante azul de toluidina e azul de metileno pertencem à classe dos fenotiazínicos (banda de absorção entre 620 e 660nm em tampão). O formato e tamanho destes corantes os tornam ótimos intercaladores de ácido nucléico, sendo assim muito importante o tempo de exposição prévia do tecido ao corante antes da exposição à radiação luminosa.

Em 1999, Oldham e Phillips, em estudos fisiológicos espectroscópicos, demonstraram a existência de mais de um mecanismo responsável pela morte celular dos microrganismos. Por exemplo, a fotoinativação de bactérias Gram-positivas como o *Streptococcus mutans* necessitam da produção de oxigênio

singleto enquanto as Gram-negativas como as *P. gingivalis* requerem a formação de radicais livres.

Silbert *et al.* (2000), em estudo *in vitro*, avaliaram o potencial da PDT na redução bacteriana intracanal. Após instrumentação mecânica, os canais radiculares foram esterilizados, divididos em dois grupos e contaminados. O Grupo-I foi inoculado com suspensão de *S. mutans* e o Grupo-II com suspensão de *E. faecalis*. A irradiação foi realizada com o laser de He-Ne com aplicação durante 4 min empregando 3,5mW de potência e um sistema de entrega por fibra óptica de 600µm, associado ao corante azul de metileno, com tempo de irradiação variando de 30 a 240s. Os resultados demonstraram que o corante sozinho promoveu redução bacteriana em 20%, mas que somente a irradiação laser não alterou a população bacteriana. No protocolo da PDT empregando 240s de tempo de irradiação houve eliminação bacteriana do *S. mutans*, no entanto, a redução de *E. faecalis* foi de 40%. Observaram também que o aumento de temperatura promovido pela irradiação não foi superior a 0,5^oC. Concluíram que a PDT pode ser um efetivo método de redução bacteriana intracanal, mas que os parâmetros devem ser ajustados para que se promova a redução de bactérias como o *Enterococcus faecalis*.

Kirill *et al.* (2000) avaliaram a ação da terapia fotodinâmica sobre microrganismos oportunistas da cavidade oral. Em estudo *in vitro* fotossensibilizaram o corante azul de metileno nas concentrações de 1%, 0,1%, 0,01% e 0,001%, sobre cultura de *Staphylococcus sp*, com um laser de He-Ne empregando intensidade de 100 mW/cm². Verificou-se toxicidade do corante a 1% durante a avaliação do tempo de pré-irradiação, sendo desta forma desprezada esta concentração. Concluíram que as concentrações de 0,1% e 0,01% e tempo de pré-irradiação de 180s e tempo de irradiação de 60 a 120s apresentaram efeitos antimicrobianos sobre a cepa testada; o corante azul de metileno tem ação bactericida efetiva quando sensibilizado pelo comprimento de onda estudado, sobre *Staphylococcus sp* (*apud*: Garcez Segundo, 2003).

Garcez Segundo *et al.* (2003) relataram que o emprego dos lasers de alta potência são eficientes na redução bacteriana intracanal, mas que sua aplicação promove aumento de temperatura propiciando danos aos tecidos adjacentes.

Afirmaram que a PDT tem se mostrado eficiente quanto à redução microbiana, sendo que o corante azul de metileno apresenta-se como um dos principais fotossensibilizadores devido à ressonância com os lasers com emissão na região vermelha do espectro eletromagnético. Segundo os autores, com a comercialização dos lasers de diodo de baixa potência, os lasers de He-Ne foram sendo substituídos, pois os lasers de diodo apresentam maior potência, não necessitam de espelhos, são mais robustos e assim como em relação aos lasers de alta potência, têm menor custo.

Zampieri *et al.* (2003) avaliaram, *in vitro*, a ação bactericida da terapia fotodinâmica com um laser de diodo de baixa intensidade (GaAIAs) sobre bactérias constituintes da microflora oral humana (*Streptococcus mitis* *Streptococcus sanguis*). Empregando uma potência de 30mW associado ao corante azul de orto-toluidina (concentração de 75µg/mL) e variando a densidade de energia entregue (3, 6 e 9J/cm²) obtiveram redução sobre *S. mitis* de 83,3%, 84,9%, 77,6%, respectivamente, e para o *S. sanguis* de 98,9%, 92,6 e 94,3% respectivamente. Concluíram que a PDT produz ação bactericida eficiente sobre bactérias causadoras de cáries de sulcos e fissuras de dentes humanos, sendo que a interação entre o laser de baixa intensidade de GaAIAs de 670nm e o corante orto toluidina são eficientes na promoção desse efeito.

Garcez Segundo (2006) estudou a redução microbiana intracanal realizada com um laser de diodo de baixa potência ($\lambda=685\text{nm}$) tendo como fotossensibilizador o corante azuleno a 25% associado ao ENDO-PTC empregando uma potência de 10mW com fibra óptica de 365µm. O microrganismo infectante foi a bactéria *E. faecalis* com período de incubação de 24h. O TPI (tempo de pré-irradiação) foi de 5min e a irradiação aplicada por 3min com a técnica helicoidal ápico-cervical. Concluiu que, com os parâmetros aplicados, a PDT foi um método efetivo na redução bacteriana intracanal frente à bactéria *E. faecalis*.

Ribeiro *et al.* (2006) avaliaram a variação de temperatura empregando laser de diodo ($\lambda=808\text{nm}$) na superfície externa da raiz de 20 incisivos centrais inferiores durante a aplicação de irradiação. No Grupo I a potência utilizada foi de 2,5W em modo contínuo com fibra óptica com $\varnothing = 400\mu\text{m}$; e no Grupo II potência

de 2,5W, frequência de 10Hz com a mesma fibra. A técnica de irradiação empregada foi a preconizada por Gutknecht (1996) por 5 vezes com intervalos de 20s entre elas. A análise da variação de temperatura foi realizada em câmara termográfica de infravermelho com sensibilidade de 0,03⁰C. Os resultados obtidos foram de uma variação de 1,6⁰C a 8,6⁰C para o Grupo I e de 1,2⁰C a 3,3⁰C para o Grupo II, estando dentro dos limites seguros de irradiação em relação aos tecidos adjacentes. Concluíram que o laser de diodo pode ser empregado *in vivo* para tratamento endodônticos em relação aos parâmetros seguros de irradiação para o tecido periodontal adjacente.

4 METODOLOGIA

4.1 Estudo da propagação de temperatura

Este ensaio buscou estabelecer um parâmetro de potência de irradiação com o laser de baixa potência que não promovesse injúrias aos tecidos adjacentes.

Foram selecionados do Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da USP três dentes unirradiculares mantidos em solução fisiológica para hidratação.

Após profilaxia com taça de borracha e pedra pomes, cada dente teve sua coroa separada da porção radicular com o auxílio de um disco de carborundum em contra-ângulo (baixa rotação).

O preparo químico cirúrgico (PQC) foi realizado com instrumentação rotatória segundo protocolo do fabricante, empregando-se como substâncias químicas auxiliares o creme de Endo-PTC e NaOCl a 0,5%.

O Comprimento Real de Trabalho (CRT) foi estabelecido pela odontometria visual, introduzindo-se a lima #10 tipo Kerr até o forame apical e recuando-se do comprimento obtido. Após o PQC todos os canais foram submetidos a irrigação e posterior aspiração do conteúdo, com 5 mL de solução EDTA-T 17%. O ápice radicular foi selado com resina fotopolimerizável.

Os terminais do termopar do tipo K foram fixados na região do terço apical na superfície externa da raiz com o auxílio de elástico ortodôntico e o espécime posicionado no suporte. O interior do canal foi secado com cone de papel, preenchido com o corante azul de metileno 0,01% e irradiado com laser de diodo de baixa potência - equipamento Thera Lase (DMC) com $\lambda=660\text{nm}$.

Os parâmetros empregados foram: potência aferida em 37,7mW; modo contínuo; fibra óptica com $\varnothing=216\mu\text{m}$; técnica de aplicação - movimento helicoidal ápico-cervical por 10 aplicações consecutivas de 28s cada (FIGURA 1).

A temperatura ambiente foi tomada como temperatura inicial (T_0) e a cada 28s, durante as 10 aplicações, a variação da temperatura foi anotada e os dados organizados.

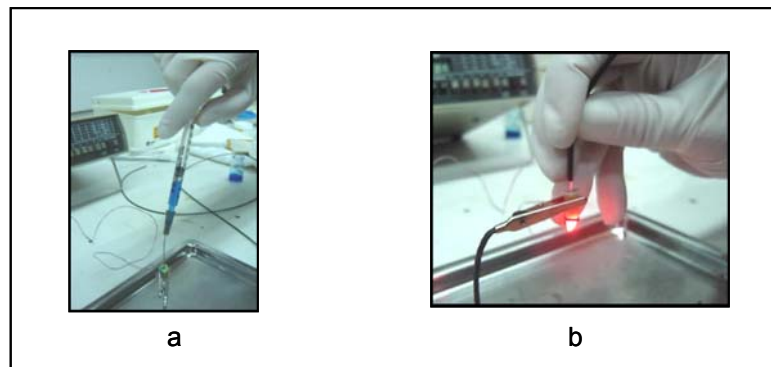


FIGURA 1- Ensaio da propagação da temperatura durante a irradiação laser; a) preenchimento do canal com fotossensibilizador azul de metileno 0,01%; b) irradiação com laser de baixa potência ($P=37,7\text{mW}$)

4.2 Estudo microbiológico

4.2.1 Preparo da suspensão bacteriana

A cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foi obtida junto ao Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB) e reativada em TSB (Tryptic Soy Broth – nutriente a base de caldo de tripicase de soja) no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) do Estado de São Paulo, onde todo o experimento microbiológico laboratorial foi desenvolvido.

Para o armazenamento da cepa em cultura, 5mL de glicerina foram adicionados a 5mL da cultura bacteriana que, distribuídos em 10 tubos tipo *ependorf*, foram levados a congelamento lento por 2h em refrigerador seguido por armazenamento em freezer a -80°C (a baixa temperatura impede o crescimento bacteriano e a glicerina mantém a bactéria viável).

Para a realização do experimento 250 μ L da cultura de um tubo tipo *eppendorf* (descongelado à temperatura ambiente) foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 10mL de TSB e incubado em estufa a 37⁰C até o momento em que o crescimento da suspensão atingiu a densidade óptica (D.O.) de 0,8 +/- 0,01, que equivale a uma concentração próxima de 1,5 x 10⁸ UFC/mL (unidade formadora de colônia por mililitro).

A leitura foi realizada em espectrofotômetro (U-2001 Spectrophotometer – HIYACHI) (FIGURA 2). Todas as inoculações foram realizadas com a suspensão bacteriana nesta concentração.

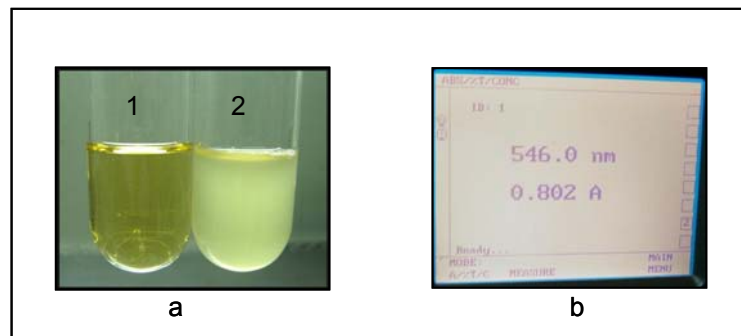


FIGURA 2 – Suspensão de *Enterococcus faecalis*. a) tubo de ensaio com TSB (1); tubo de ensaio com TSB + cultura de *E. faecalis* (2); b) leitura da densidade óptica (D.O.=0,802) da suspensão aferida em espectrofotômetro em absorvância (A) com $\lambda=546\text{nm}$

4.2.2 Modelo experimental

Foram selecionados, junto ao Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da USP–SP, após observação em exame visual e radiográfico, 28 dentes unirradiculares extraídos que apresentavam rizogênese completa e um único canal. Permaneceram armazenados em uma caixa acrílica sobre gaze úmida em solução fisiológica (câmara de hidratação), à temperatura ambiente.

Os espécimes foram preparados de forma idêntica aos espécimes empregados no ensaio de variação de propagação de temperatura (4.1).

Após o selamento apical foram acondicionados em uma caixa acrílica (FIGURA 3) e esterilizados em autoclave a 121⁰C, por 20min.

Observa-se que nesta caixa o espécime fica posicionado verticalmente e permite uma distribuição uniforme tanto da suspensão microbiana quanto da substância nutriente (TSB) inoculadas. Os demais passos foram realizados em câmara de fluxo laminar.

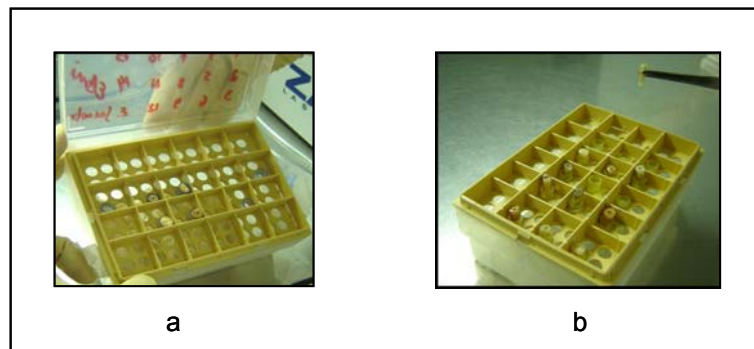


FIGURA 3- a) Caixa acrílica esterilizável; b) posicionamento vertical dos espécimes

Descrição dos grupos experimentais:

Os espécimes foram aleatoriamente divididos em 2 grupos com 14 espécimes cada (QUADRO 1).

QUADRO 1: Grupos experimentais

Grupo		procedimento
I (14)	GCI (4)	controle I
	GI (10)	azul de metileno 0,01% + laser de baixa potência (PDT)
II (14)	GCI (4)	controle II
	GII (10)	laser de alta potência

Os espécimes foram inoculados com 10 μ L da suspensão de *E. faecalis* e receberam imediatamente acréscimo de 10 μ L de TSB. Foram então incubados por 7 dias em estufa a 37^oC, com acréscimo de 20 μ L de TSB a cada 48h, simulando as condições encontradas *in vivo*.

Após este período, os 4 espécimes do **grupo controle I (GCI)** receberam imediatamente o preparo para a contagem de UFC/mL. Os espécimes foram colocados em tubos de ensaio contendo 10mL de solução salina 0,85% e submetidos à agitação mecânica (*Vortex*) de 200rpm por 30s. Após 30 min em repouso foram realizadas diluições seriadas e 3 gotas de 25 μ L por diluição foram inoculadas em três placas de Petri contendo o meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar).

A coleta de dados foi realizada após 24h de incubação das placas em estufa a 37 $^{\circ}$ C (FIGURA 4) por contagem de UFC/mL.

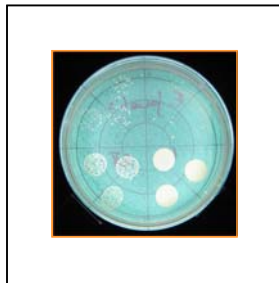


FIGURA 4 – Placa de Petri após 24h de incubação a 37 $^{\circ}$ C, com três gotas da suspensão por diluição (10^0 , 10^1 , 10^2 e 10^3)

Antes da realização da aplicação de irradiação nos espécimes do **GI- PDT**, o equipamento laser de diodo de baixa potência foi calibrado (equipamento Thera Lase – DMC ($\lambda = 660\text{nm}$)) (FIGURA 5).

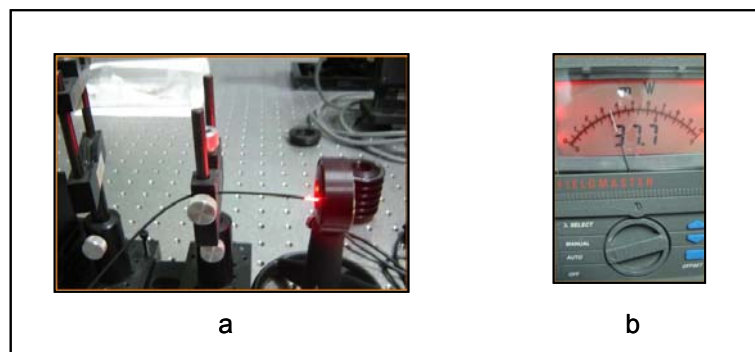


FIGURA 5- a) Calibração do laser de baixa potência com detector (LM01, Coherent-USA); b) Potência aferida = 37,7mW

Em seguida os 10 espécimes tiveram o interior do canal preenchido com o corante **azul de metileno 0,01%**, e, após 5 min (TPI – tempo de pré-irradiação) realizou-se a **irradiação com laser de baixa potência**, empregando uma fibra óptica ($\varnothing=216\mu\text{m}$); potência aferida em 37,7mW; modo contínuo; tempo de irradiação de 28s para cada aplicação em movimento helicoidal ápico-cervical, por 10 vezes consecutivas (FIGURA 6).

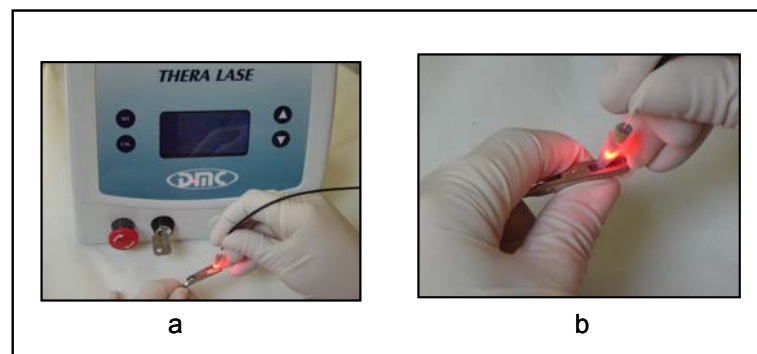


FIGURA 6 – a) Aplicação da irradiação com laser de baixa potência associado ao azul de metileno 0,01%; b) momento em que a fibra óptica atinge o terço cervical do espécime

Imediatamente após a aplicação da irradiação foi realizado preparo e coleta dos espécimes para contagem das UFC/mL conforme protocolo do GCI.

Antes da realização do procedimento de irradiação dos espécimes do **GII – alta potência**, o equipamento laser de diodo de alta potência foi calibrado (equipamento ZAP alta 3,5W – ZAP LASERS ($\lambda= 808\text{nm}$)) (FIGURA 7).

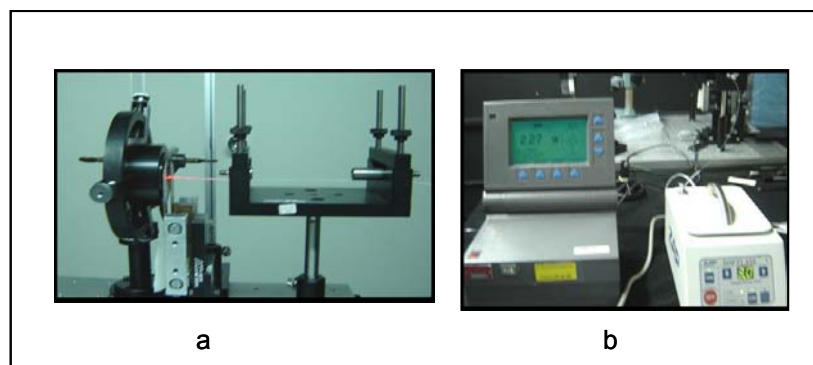


FIGURA 7 – a) Calibração do laser de alta potência com detector (Lab Master Ultima, Coherent–USA); b) Potência aferida = 2,27W

No **grupo controle II (GCII)** os espécimes foram inoculados e incubados de forma idêntica aos do G I. Após o período de 7 dias, 4 espécimes receberam imediatamente o preparo para a contagem das UFC/mL com o mesmo protocolo do GCI.

Em seguida, os 10 espécimes do **GII** foram irradiados com **laser de alta potência** com os parâmetros: potência aferida de 2,27W em modo de emissão interrompido (potência média = 1,13W) com fibra óptica ($\varnothing = 200\mu\text{m}$) e técnica em movimento helicoidal ápico-cervical por 5 irradiações de 10s cada e intervalo de 20s entre elas, seguido por um tempo de espera de 1 min e novamente foram aplicadas mais 5 irradiações de 10s cada com intervalo de 20s entre elas (FIGURA 8).

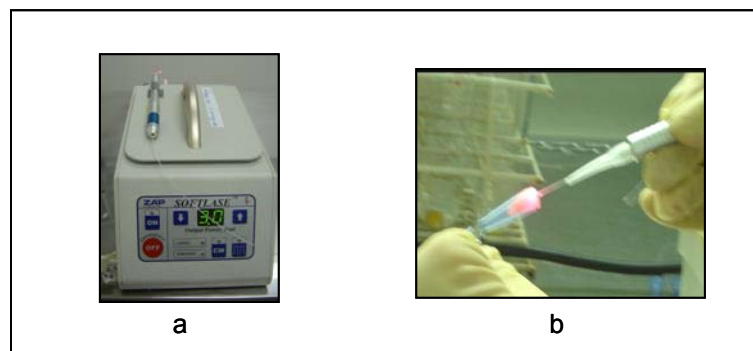


FIGURA 8 – a) laser de alta potência; b) Aplicação da irradiação com laser de alta potência

Imediatamente após a aplicação da irradiação foi realizado preparo e coleta para contagem das UFC/mL conforme protocolo do GCI.

Os resultados foram tabelados e analisados estatisticamente por diferença de médias.

4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise em MEV (Scanning Microscope JSM-5200 –JEOL) foi realizada em 4 espécimes, dois de cada grupo de procedimento experimental (GI e GII). Este estudo permitiu observar os aspectos morfológicos da superfície interna da parede do canal radicular.

Após a aplicação do respectivo protocolo de irradiação laser de cada grupo e sem realizar os procedimentos de irrigação e aspiração, os espécimes foram esterilizados a 121^oC por 20 min. Com auxílio de um disco de carborundum efetuou-se um sulco não invasivo ao interior do canal radicular (na superfície externa da amostra), no sentido méso-distal e a clivagem foi obtida no sentido do longo eixo do dente.

Um fragmento de cada espécime (FIGURA 9a) foi fixado sobre o suporte, metalizado (FIGURAS 9b e 9c) e levado para leitura ao Microscópio Eletrônico de Varredura.

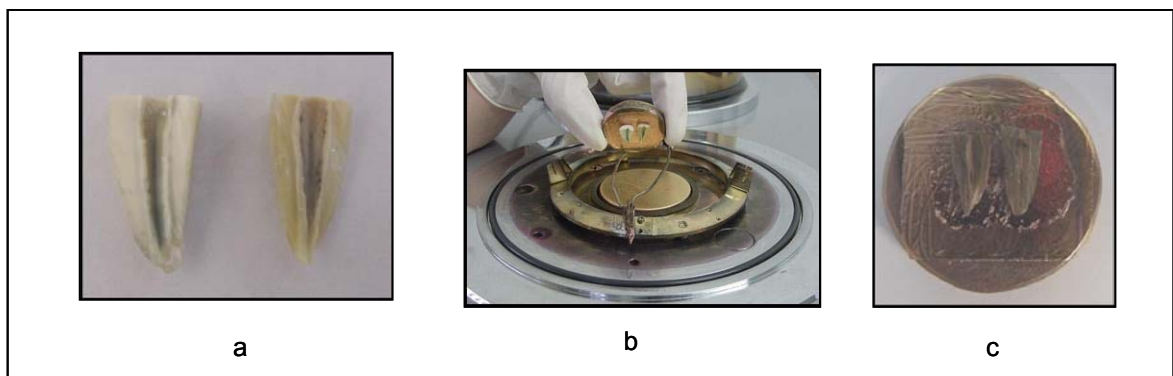


FIGURA 9– a) espécimes clivados no sentido do longo eixo; b) espécimes fixados no suporte antes da metalização; c) suporte com espécimes após metalização

5 RESULTADOS

5.1 Estudo da propagação da temperatura

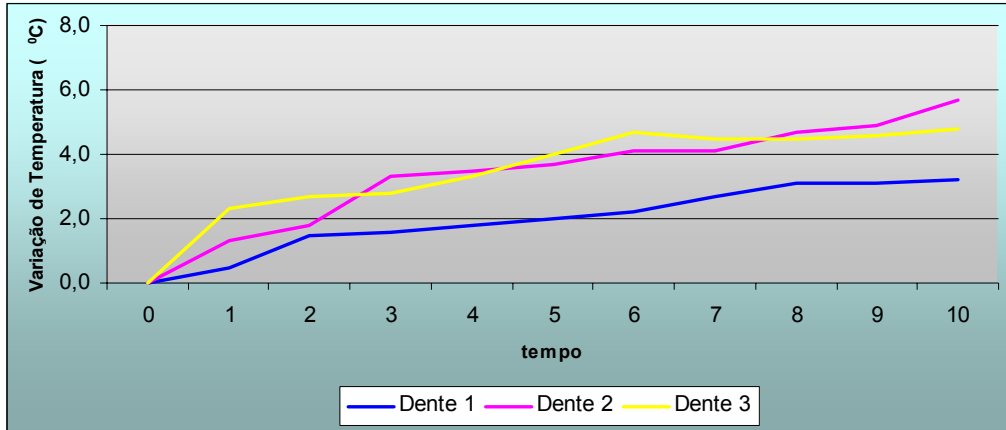


GRÁFICO 1- Variação da temperatura durante aplicação da irradiação com laser de baixa potência; tempo = 28s x 10 aplicações

Conforme o GRÁFICO 1, empregando o protocolo de irradiação instituído, (potência de 37,7mW – modo contínuo), o aumento de temperatura foi, em média, de 3,9^oC, estando de acordo com os padrões de segurança (ERIKSSON & ALBREKTSSON, 1983) quanto ao risco de promover injúrias aos tecidos adjacentes.

5.2 Estudo microbiológico

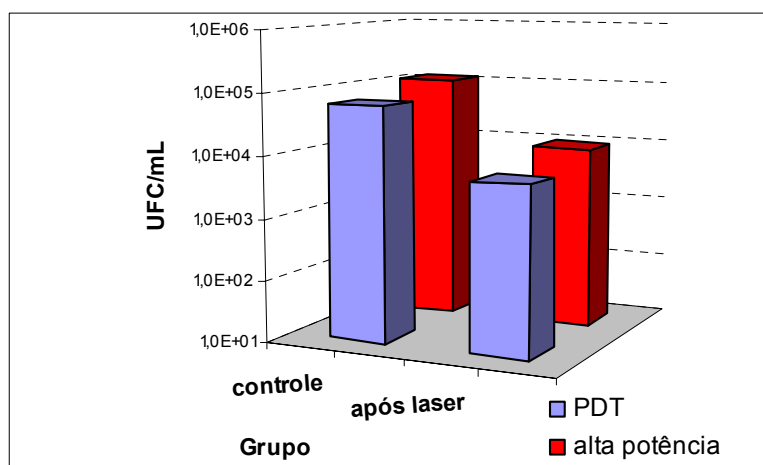


GRÁFICO 2 – Média de UFC/mL dos grupos experimentais, em relação ao *E. faecalis*, no sistema de canais radiculares

Observando-se o GRÁFICO 2 constata-se uma redução microbiana intracanal, sendo que:

GRUPO I – Terapia fotodinâmica (PDT) – irradiação com laser de baixa potência associada ao corante azul de metileno 0,01%

	média	Redução microbiana (%)
controle	$6,5 \times 10^4$	91,9
Após PDT	$5,2 \times 10^3$	

GRUPO II – irradiação com laser de alta potência

	média	Redução microbiana (%)
controle	$1,1 \times 10^5$	91,6
Após laser	$9,4 \times 10^3$	

A comparação entre grupo controle e grupo irradiado para tratamentos PDT e alta potência, foi feita através do teste t de Welch.

Os valores das estatísticas para as comparações dos grupos se encontram na TABELA 1, e os resultados do experimento se encontram no GRÁFICO 3.

TABELA 1: Valores estatísticos

Estatísticas	Controle x alta potência	Controle x PDT	PDT x alta potência
Diferença das médias (UFC/mL)	102230,0	58914,0	3639
Erro padrão da diferença (UFC/mL)	18912,6	11256,1	5008
Valor crítico 5%	2,8	4,3	2,16
Limite Inferior (UFC/mL)	49720,0	10482,8	-7180
Limite Superior (UFC/mL)	154740,0	107345,2	14458
Estatística T	5,4	5,2	0,73
G.L.	4,0	2,5	14
P significância	0,006	0,035	0,48
t(0,975)	2,8	4,3	2,16
t(0,025)	-2,8	-4,3	-2,16
Redução microbiana intracanal	92%	92%	

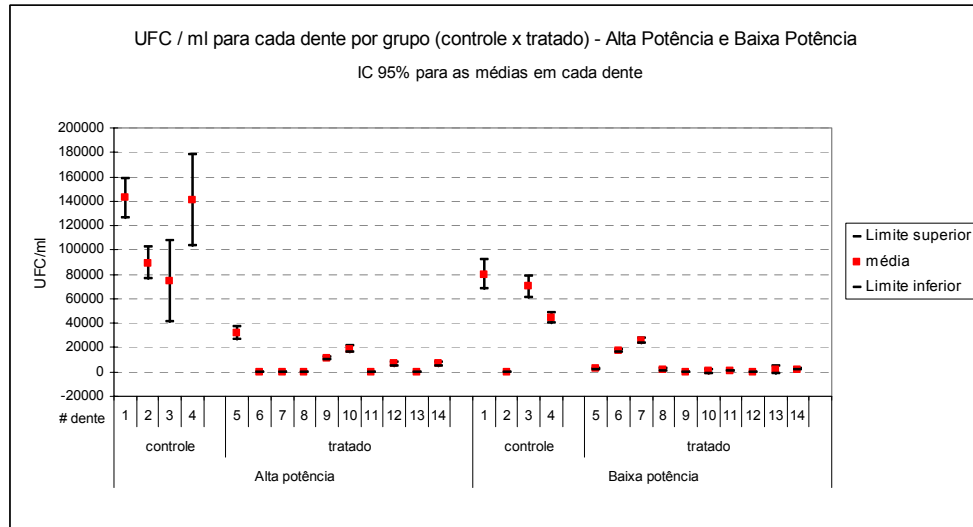


GRÁFICO 3 - Análise estatística por diferença de médias

Os intervalos de confiança 95% para as médias de cada grupo testado se encontram no gráfico GRÁFICO 4.

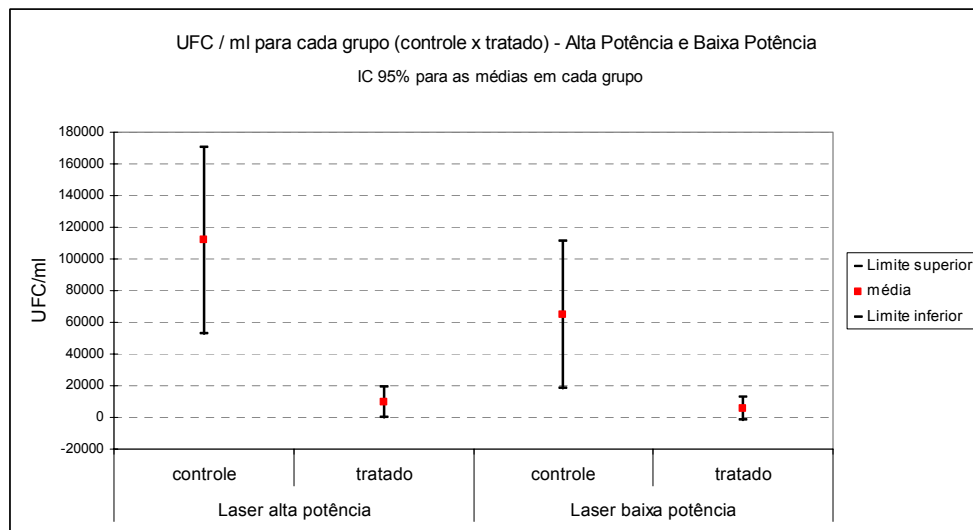


GRÁFICO 4 - Análise interferencial da diferença de médias

Análise estatística

G I (PDT) - O intervalo de confiança 95% para a diferença das médias foi de $58.914 \text{ UFC/mL} \pm 48.431 \text{ UFC/mL}$ onde o valor crítico 4,3 foi o valor necessário para a teste t ao nível de significância 5% com $p=0,03$.

GII (laser alta potência) - O intervalo de confiança 95% para a diferença das médias foi de 102.230 UFC/mL \pm 52.510 UFC/mL onde o valor crítico 2,78 foi o valor necessário para a teste t ao nível de significância 5% com $p=0,0057$.

Comparação PDT (G I) x alta potência (G II) O intervalo de confiança 95% para a diferença das médias dos grupos irradiados foi de 3639 ± 10.819 (-7180, 14.458), que contém o valor zero. Portanto não há diferença significativa entre as quantidades de UFC/mL nos dois grupos irradiados, reforçando que o valor da estatística T é 0,76 enquanto que o valor crítico a um nível de significância 5% é de $vc=2,16$.

O estudo estatístico por diferença de médias demonstrou que houve diferença significativa entre os resultados dos grupos controle com o respectivo grupo de redução (baixa ou alta potência).

Demonstrou também que o nível de UFC/mL após a aplicação da irradiação laser não apresenta diferença estatística entre os grupos GI – PDT e GII - alta potência.

5.3 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias obtidas por LAGE-MARQUES, EDUARDO & MATSUMOTO (1995) em canais radiculares com preparo químico-cirúrgico quando comparadas as micrografias da superfície interna do canal radicular na região do terço apical (FIGURA 12a) de um espécime do Grupo I (PDT) permitem observar que não ocorreram alterações estruturais na morfologia dos túbulos dentinários após a irradiação (FIGURAS 12b, 12c).

A visualização do *Enterococcus faecalis* na entrada de um túbulo dentinário evidencia a relação dimensional entre ambos (FIGURA 12d).

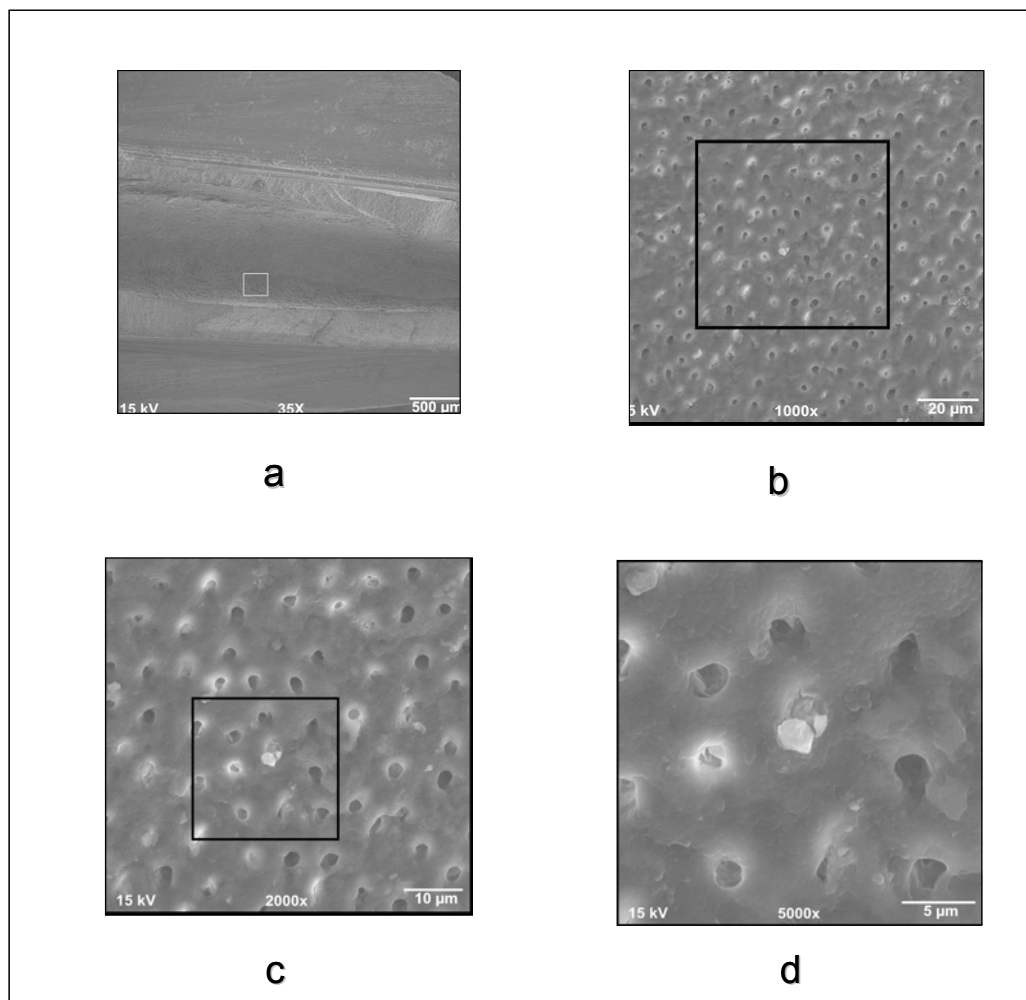


FIGURA 12– a) região do terço apical de uma amostra irradiada com laser de baixa potência ($P= 37,7\text{mW}$); b) túbulos dentinários sem alteração morfológica; c) túbulos dentinários em maior aumento; d) bactéria *E. faecalis* na entrada de um túbulo dentinário

Analisando-se as micrografias da superfície interna do canal radicular na região do terço apical (FIGURA 13a) de um espécime do Grupo II (irradiação com laser de alta potência) são observadas alterações estruturais na morfologia na superfície da dentina intracanal após a aplicação da irradiação laser (FIGURAS 13b, 13c) apresentando um aspecto de escamas devido a forma arredondada e ângulo atenuado na periferia tubular.

Foi possível notar nos espécimes deste grupo a presença da bactéria *E. faecalis* e a relação dimensional entre ambos (FIGURA 13d).

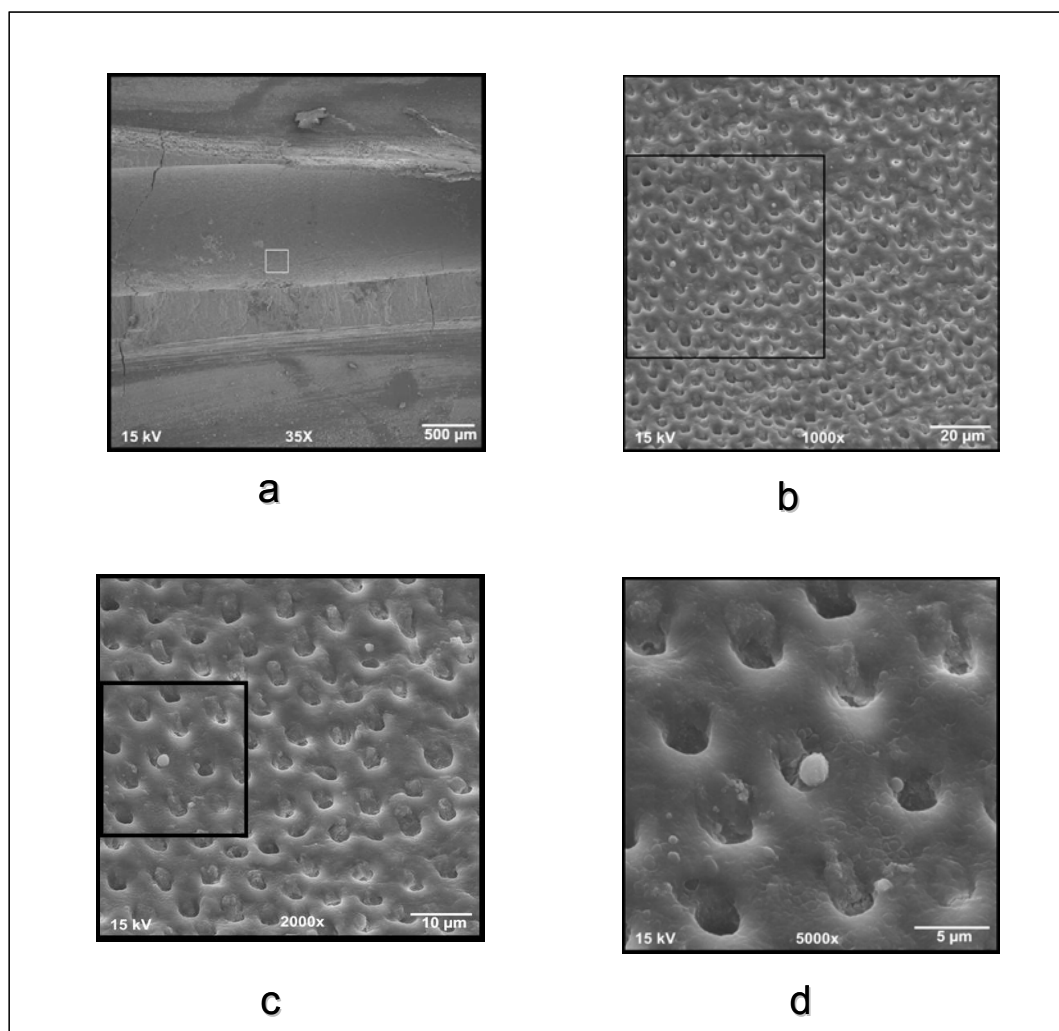


FIGURA 13 – a) região do terço apical da amostra após irradiação com laser de alta potência ($P=2,27W$); b) túbulos dentinários apresentam alteração morfológica; c) túbulos dentinários em maior aumento evidenciando uma forma arredondada com um ângulo atenuado na superfície periférica e presença da bactéria *E. faecalis*; d) um exemplar da bactéria *E. faecalis* na entrada de um túbulo dentinário.

Na FIGURA 14 pode-se observar na micrografia a presença de um remanescente microbiano (*E. faecalis*) na entrada do túbulo dentinário da superfície interna do canal.

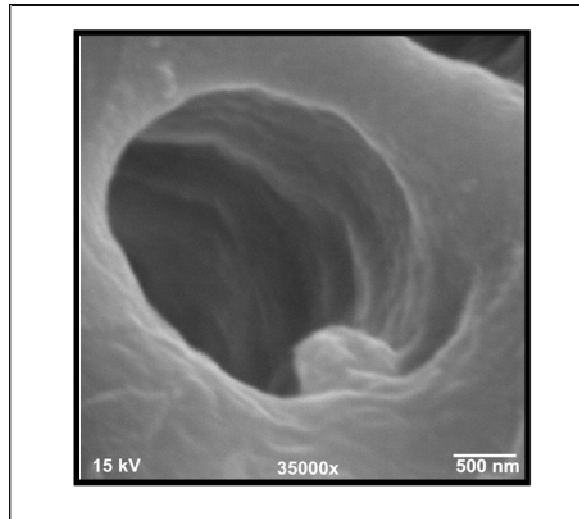


FIGURA 14 - *E. faecalis* na entrada de um túbulo dentinário na superfície radicular (espécime do GII)

Na FIGURA 15 a micrografia apresenta em detalhe a morfologia da bactéria *Enterococcus faecalis*.

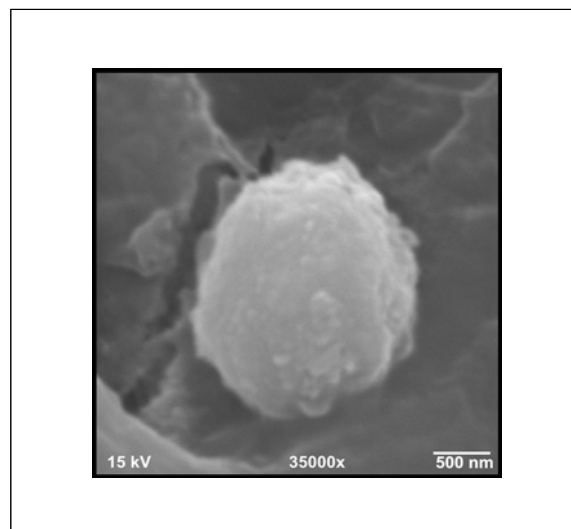


FIGURA 15 – Bactéria *Enterococcus faecalis*

6 DISCUSSÃO

A presença de microrganismos no sistema de canais radiculares propicia o aparecimento de lesões periapicais como resultado da agressão microbiana. Sendo assim, a terapia endodôntica deve ser fundamentada na eliminação da infecção (Nair *et al.*, 1990; Sundqvist *et al.*, 1998; Peciulienė *et al.*, 2000; Love, 2001), pois a permanência de uma microbiota viável no interior dos túbulos dentinários, dependendo do seu fator de virulência, pode propiciar a reinstalação do processo patogênico (Sundqvist, 1976; Oguntebi, 1994; Siqueira Jr. *et al.*, 1996; Sjögren *et al.*, 1997) e conseqüentemente o insucesso da terapia instituída (Haapasalo & Orstavik, 1987; Eduardo e Gouw-Soares, 2001; Lana *et al.*, 2001; Ferrari, 2001). Portanto, a desinfecção do sistema de canais radiculares é fator decisivo para o sucesso terapêutico (Peciulienė *et al.* 2000).

A microbiota encontrada no sistema de canais é diversificada e extremamente dinâmica (Sundqvist, 1992, 1998; Sirien *et al.*, 1997; Love, 2001). Nos casos de polpa necrosada a flora bacteriana encontra rico substrato e ocorrem adaptações metabólicas dos espécimes (Shovelton, 1964; Radaelli, 2002). A bactéria *Enterococcus faecalis* é a espécie predominantemente encontrada nos casos de lesão periapical refratária (Gomes, Lilley & Drucker, 1996; Siren *et al.*, 1997; Sjögren *et al.*, 1997; Peciulienė, 2000; Ferrari, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003). Observa-se também que sua resistência vem crescendo frente a diversos antibióticos e antimicrobianos empregados no tratamento endodôntico (Siqueira Jr. e Uzeda, 1996; Murray *et al.*, 1998; Dahlén *et al.*, 2000; Zouani & Araj, 2001; Chávez de Paz *et al.*, 2003) e por ser um agente superinfecante em periodontites e infecções endodônticas refratárias (Love, 2001) o microrganismo *Enterococcus faecalis* foi eleito para este estudo sobre redução microbiana intracanal.

Ao se inocular a suspensão de *E. faecalis* na concentração descrita observou-se, após 7 dias, a formação de um biofilme bacteriano representativo para a contagem de UFC/mL. A permanência dos espécimes em incubação por

tempo superior não se justifica, pois se estabelece uma saturação da população microbiana devido à competição por nutrientes e pelo espaço físico (sistema de canais).

A redução microbiana intracanal realizada com lasers de alta potência tem demonstrado resultados satisfatórios (Gutcknecht, 1996, 2000; Walsh 1997, 2003; Eduardo e Gouw-Soares, 2001; Lage-Marques, 2002; Radaelli, 2002) e estudos com lasers de diodo de alta ou de baixa potência (este associado a um corante – terapia fotodinâmica - PDT), também têm revelado resultados promissores, mas que, porém necessitam de definição de protocolos de aplicação (Dobson & Wilson, 1992, Wilson, 1992, 1993; Moritz *et al.* 1997; Lage-Marques, 1998; Klim *et al.* 2000; Gutknecht, 2000; Zampieri, 2003; Gutknecht & Eduardo, 2004, Garcez Segundo *et al.*, 2006). Neste estudo os protocolos de irradiação obtiveram uma redução microbiana intracanal de 91,6% com laser de diodo de alta potência e de 91,9% após a PDT frente à suspensão da bactéria *E. faecalis* incubada por 7 dias sob condições favoráveis de crescimento da população. Ressalta-se aqui que a inoculação dos espécimes se fez após o PQC e não foram realizados os procedimentos de irrigação e aspiração, pois tanto o PQC quanto a irrigação/aspiração potencializariam a redução microbiana com uma interferência não padronizada.

O equipamento de diodo de alta potência foi selecionado devido a sua penetrabilidade ($\lambda=808\text{nm}$) e por possuir fibra óptica de $\varnothing = 200\mu\text{m}$ capaz de atingir o terço apical. Também pode ser citado como diferencial na sua escolha, o fato de ser portátil e de apresentar um custo reduzido em comparação aos demais lasers de alta potência.

O protocolo de utilização dos lasers de alta potência é criterioso quanto ao aumento de temperatura inerente ao processo de aplicação da irradiação. A desnaturação do microrganismo ocorre em função deste aumento, porém os tecidos adjacentes são susceptíveis a uma elevação de temperatura superior a 10°C , que, se mantido por mais de 1 min, promove ação deletéria (Eriksosn & Albrektsson, 1983; Walsh, 1997). Neste estudo optou-se por um protocolo já instituído e seguro para laser de alta potência de acordo com Radaelli (2002) e Ribeiro (2006).

Com os lasers de baixa potência a desnaturação do microrganismo ocorre devido aos danos estruturais (parede bacteriana) ou metabólicos causados pelos espécimes de oxigênio produzidos quando o fotossensibilizador é ativado pela luz laser, promovendo a morte celular (Wilson, 1995). Nestes casos a variação de temperatura é menos crítica devido a baixa potência empregada, mas também deve ser conhecida. O estudo prévio demonstrou que, com o protocolo empregado, houve aumento de 3,9⁰C, em média, estando portanto, dentro dos padrões de biocompatibilidade (Eriksson & Albrektsson, 1983; Walsh, 1997).

O equipamento laser de diodo de baixa potência selecionado possui $\lambda=660$ nm apresentando ressonância ao corante empregado (azul de metileno). A fibra óptica com diâmetro de 216 μ m, fundamental para a irradiação intracanal, foi desenvolvida pelo fabricante para este estudo, sendo necessário o desenvolvimento de suporte dentro dos padrões de biosegurança para o seu uso clínico. Este equipamento também possui dimensões reduzidas, o que facilita seu transporte, manuseio e versatilidade e é mais acessível economicamente em comparação aos lasers de alta potência.

A potência de saída de 37,7mW foi obtida empregando-se a potência máxima do aparelho com esta fibra (50mW), sendo esta 10 vezes maior que a empregada por Silbert (2000), cujo estudo apresentou 40% de redução microbiana frente ao *E. faecalis*, sugerindo o autor ajuste deste parâmetro para se alcançar uma eficiência maior.

O TPI empregado esta de acordo com Walsh (1997), Wainwright (1998) Kiril (2000) quanto à necessidade de um período para que o corante possa se intercalar ao ácido nucléico e assim promover a morte da célula alvo quando a luz laser é irradiada.

O corante azul de metileno 0,01% foi eleito por ser um fotossensibilizador consagrado na literatura, ser de fácil aquisição e manuseio e apresentar coeficiente de absorção compatível com o comprimento de onda do laser escolhido (Wainwright, 1998; Silbert *et al.* 2000; Kiril, 2000; Garcez Segundo *et al.*, 2003; Walsh, 2003)

A análise em MEV da dentina da superfície intracanal observada após a irradiação com laser de alta potência constatou que houve alteração no perímetro tubular que passou a apresentar uma forma mais arredondada sem, no entanto, promover a obliteração da entrada dos túbulos estando de acordo com relatos de Klim *et al.* (2000). Estudos deveriam ser realizados para avaliar a possível influência desta alteração morfológica em relação a permeabilidade dentinária após a irradiação.

Na análise, em MEV, do espécime após a PDT, comparada ao achados de Lage-Marques, Eduardo & Matsumoto (1995) em espécimes não irradiados, nenhuma alteração morfológica foi observada.

Não foram realizados os procedimentos de irrigação e aspiração após os protocolos instituídos e desta forma pôde ser notada, na leitura em MEV, a presença de *E. faecalis* na superfície dentinária.

Recomenda-se, independente do equipamento laser escolhido, realizar a irradiação laser após o preparo químico cirúrgico e imediatamente antes da obturação do canal, com uso de medicação intracanal entre sessões, propiciando um incremento à redução microbiana obtida.

Ressalta-se aqui a importância do treinamento para o manuseio e prática de qualquer equipamento laser devido à possibilidade de promover sérios danos ao paciente ou ao profissional quando utilizado de modo equivocado.

O emprego da tecnologia laser na prática clínica deve ser visto como uma terapia complementar ao tratamento tradicional, e este ser executado com todo rigor da técnica, não comprometendo desta forma o sucesso do tratamento, mesmo quando se têm à disposição equipamentos tecnológicos.

7 CONCLUSÕES

Concluiu-se que:

- Os protocolos empregados com lasers de diodo em parâmetros de alta ou baixa potência (PDT) foram efetivos quanto a redução microbiana intracanal frente a bactéria *Enterococcus faecalis*.
- Não houve diferença estatisticamente significativa entre os protocolos de alta potência e a PDT estudados.
- A terapia fotodinâmica (PDT) pode ser considerada como coadjuvante a terapia endodôntica em casos de lesão periapical, assim como a irradiação com laser de alta potência.
- Alterações morfológicas ocorreram na superfície dentinária intracanal após irradiação com laser de diodo de alta potência. Não foram observadas alterações morfológicas na dentina após PDT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BURGNERA, J.R.A; PINHEIRO, A.L.B. **Lasers na Odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998. 256 p.
2. CHÁVEZ DE PAZ, L.E.; DAHLEN, G.; MOLANDER, A.; MÖLLER, A.; BERGENHOLTZ, G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. **Int Endod J** v. 36,n. 7,p. 500-508, 2003.
3. DAHLÉN, G.; SAMUELSSON, W.; MOLANDER, A.; REIT, C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. **Oral Microbiol Immunol** v. 15,n. 5, p. 309-312, 2000.
4. DOBSON J, WILSON M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low power laser. **Arch Oral Biol** v. 37,n. 11,p. 883-887, 1992.
5. EDUARDO, C.E; GOUW-SOARES, S. The use of lasers in endodontics. **J Oral Laser Applic** v. 1, p. 221-226, 2001.
6. ERIKSSON, A.R.; ALBREKTSSON, T.. Temperature threshold levels for heat induced bone tissue injury: a vital microscopic study in the rabbit. **J Prosthet Dent** v. 50,n. 1,p.101-107, 1983.
7. FERRARI, P.H.P.; CAI. S.; BOMABANA, A.C. Effect of endodontic procedures on enterococci enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. 2001. **Int Endod J** v. 38 ,p. 372-380, 2005.
8. GARCEZ SEGUNDO, A.S.; SOUZA, F.R.; NUÑEZ, S.C.; KATER, J.M.; RIBEIRO, M.S. Terapia fotodinâmica em odontologia – laser de baixa potência para redução microbiana. **Rev. Ass Paul Cir Dent** v.75, n.e, p 223-226, 2003.
9. GARCEZ SEGUNDO, A.S. **Laser em baixa intensidade associado a fotossensibilizador para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico**. 2003. Dissertação (Mestrado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
10. GARCEZ SEGUNDO, A.;NUÑEZ, S.C.; JORGE, A.O.C.; LAGE-MARQUES, J.L.; RIBEIRO, M.S. Efficiency of NaOCl and laser- assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis in vitro* (no prelo) **Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol and Endo**, 2006.
11. GOMES, B.P.; LILLEY, J.D.; DRUCKER, D.B.. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. **Int Endod J** v. 29, n. 4,p. 235-241, 1996.

12. GUTKNECHT, N.; MORITZ, A.; CONRAD, G; SIEVERT, T.; LAMPERT, F. Bacterial effect of the Nd:YAG laser in root canal. **J Clin Laser Med Surg** v.14,n. 2,p. 77-80, 1996.
13. GUTKNECHT, N.; KAISER, F.; HASSAN, A.; LAMPERT, F. Long-term clinical evaluation of endodontically treated teeth by Nd:YAG lasers. **J Clin Laser Med Surg** v.14,n. 1,p. 7-11, 1996.
14. GUTKNECHT, N.; van GOGSWAARDT, D.; CONRADS, G.; APEL, C.; SCHUBERT, S.; LAMPERT, F. Diode laser radiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin. **J Clin Laser Med and Surg**, v. 18,n. 2,p. 57-60, 2000.
15. GUTKNECHT, N.; EDUARDO, C.E. **A Odontologia e o Laser. Atuação do laser na especialidade odontológica.** Quintessence Ed Ltda., 320p., 2004.
16. HAAPASALO, M.; ORSTAVIK, D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. **J Dental Research**, v. 66,n. 8,p. 1375-1379, 1987.
17. KLIM, J.D.; FOX, D.B.; COLUZZI, D.J.; NECKEL, C.P.; SWICK, M.D. The diode laser in dentistry. **Wavelength**, v. 8,n. 4,p.13-16, 2000.
18. LAGE-MARQUES, J.L.; EDUARDO, C.P; MATSUMOTO, K.. A study morphological changes of root canal walls lased by pulsed Nd:YAG laser. **J Japan Endod Assoc**, v. 16, n.1, p. 64-69, 1995.
19. LAGE-MARQUES, J.L. EDUARDO, C.P. **O emprego do laser na endodontia.** *Apud: ENDODONTIA* – BERGER C.R. e colaboradores. Ed. Pancast, cap. 23 p. 400-414, 1998.
20. LAGE-MARQUES, J.L. Um novo auxiliar na terapia endodôntica – Laser. **Opinion Makers – Tecnologia e Informática**, p. 74-89, 2002.
21. LANA, M.A.; RIBEIRO-SOBRINHO, A.P.; STHELING, R.; GARCIA, G.D.; SILVA, B.K.C.; HAMDAN, S. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. **Oral microbial immunol** 2001;16(2):100-5.
22. LEONARDO, M.R.; LEAL, J.M. **Endodontia: tratamento de canais radiculares.** 2ª. Edição, São Paulo: Panamericana, 1991, p. 1-18.
23. LOVE, R. M. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. **Int Endod J** v. 34,n. 5,p. 399-405, 2001.
24. MORITZ, A.; GUTKNECHT, N.; GOHARKHAY, K.; SCHOOP, U.; WERNISCH, J.; SPERR, W. *In vitro* irradiation of infected root canals with a diode laser: Results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. **Quintessence Int** v. 28,n. 3,p. 205-209, 1997.

25. 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. **Lasers Surg Med** v. 21,n. 3,p. 221-226, 1997.
26. MURRAY, P.K.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.; PFALLER, M.A. *Streptococcus* and other Gram-positive cocci. In: Murray, P K, Rosenthal K.S., Kobayashi G., Pfaller M.A. **Medical Microbiology**. St. louis, Missouri: Mosby p. 206-208.1998.
27. NAIR, P.N.R.; SJÖGREN, U.; KREY, G.; KAHNBERG, K.; SUNDQVIST, G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscpic follow-up study. **J Endod** v. 16,n. 12,p. 580-588, 1990.
28. OGUNTEBI BR. Dentine tubule infection and endodontic therapy implications. **Int Endod J** v. 27,n.4,p. 218-222, 1994.
29. OLDHAM, T.C.; PHILIPS, D. Flash photolysis of sensitizers in microbes. **J Phys Chem B** v. 103, n. 43, p. 9333-9349, 1999.
30. PECIULIENE, V.; BALCIUNIENE, I.; ERICKSEN, H.M.; HAAPASALO, M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. **J Endod** v. 26,n. 10,p. 593-595, 2000.
31. PINHEIRO, E.T.; GOMES, B.P.F.A.; FERRA, C.C.R.; TEIXEIRA, F.B.; ZAIA, A.A.; SOUZA FILHO, F.J. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral Microbiol Immunol** v. 18, n.2,p. 100-103, 2003.
32. RADAELLI, C.A.R.M. **Avaliação da redução bacteriana em conduto radicular infectado e irradiado com laser de diodo estudo *in vitro***. 2002. Dissertação (Mestrado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
33. RIBEIRO, A.C; PEREIRA, T.M.; NOGUEIRA G.E.C.; ANTONIAZZI, J.H.; MORITZ, A.; ZECELL, D.M. Thermal effects of diode laser during endodontic treatments. In: abstract **10th meeting of the International Society of Lasers in Dentistry (ISLD)**, Berlin, Alemanha, p.144, 2006.
34. SHOVELTON, D.S. The presence and distribution of micro-organisms within non-vital teeth. **Br dent J** v.,17, n. 3,p. 101-107, 1964.
35. SILBERT, T.; BIRD, O.S.; MILBURN, G.J.; WALSH, L.J. Disinfection of root canals by laser dye photosensitization. **J Dent Res** **2000 (IADR)** 79:569
36. SIQUEIRA Jr, J.F., UZEDA, M. Disinfectionby calcium hydroxide paste of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bactéria. **J Endod** v. 22, n. 12,p. 674-676, 1996.

37. SIREN, E.K.; HAAPASALO, M.P.P.; RANTA, K.; SALMI, P.; KEROSUO, E.N.J. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation **Int Endod J** v.30, n.2, p.91-95, 1997.
38. SJÖGREN, U.; FIADOR, D.; PERSON, S.; SUNDQVIST, G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontics treatment of teeth with apical periodontites. **Int Endod J**, v. 30,n. 5,p. 297-306, 1997.
39. SUNDQVIST G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. **Sweden: Umea University; Odontologic dissertation** 1976
40. SUNDQVIST G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiol Immunol** v. 7,n. 5,p. 257-262, 1992.
41. SUNDQVIST, G.; FIGDOR D.; PERSSON S.; SJOGREN U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 85,n. 1,p. 86-93, 1998.
42. WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J Antimicrob Chemother** v. 42,n. 1,p. 13-28, 1998.
43. WALSH, L.J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. **Aust Dent J**, v. 42,n. 5,p. 302-306, 1997.
44. WALSH, L.J. The current status of laser applications in dentistry. **Aust Dent J** v. 48,n. 3,p. 146-155, quiz 198, 2003.
45. WILSON, M.; DOBSON, J.; HARVEY, W. Sensitization of oral bacteria to killing by low power laser radiation. **Curr Microbiol** v. 25,n. 2,p. 77-81, 1992.
46. WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potencial use in the treatment of caries and periodontal disease. **J Appl Bacteriol**, v.75,n.4,p.299-306,1993.
47. WILSON, M. Bacteria in supregengival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer **J Appl Bacteriol**, v. 78,n. 5,p. 569-574, 1995.
48. ZAMPIERI, M.J.P.; COGO, J.C.; GENOVESE. W.J.; BARBOSA, A.D. Ação bactericida da terapia fotodinâmica (AsGaAl) sobre bactérias *St mitis* *St sangui*. "in vitro" **Rev Bras Implant** v. 9,n. 2,p. 16-17, 2003.
49. ZOUAIN, M. G.; ARAJ, G.F. Antimicrobial resistance of *Entrococci* in Lebanon. **Int J Antimicrob Agents** v.17,n.3,p.209-213, 2001.

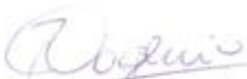
ANEXO

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA****PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 139/05

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "*Estudo comparativo da redução microbiana intracanal entre um laser em baixa intensidade e fotossensibilizador e um laser em alta intensidade*", de responsabilidade da Pesquisadora **Eleni Cristina Kairalla**, sob orientação do Professor Doutor **José Luiz Lage-Marques**.

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

São Paulo, 01 de setembro de 2005


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