



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**AÇÃO DO LASER DE Er,Cr:YSGG, QUANDO
ASSOCIADO OU NÃO AO FLÚOR TÓPICO, NA
PREVENÇÃO DA PROGRESSÃO DE LESÕES DE
CÁRIE INCIPIENTES DE ESMALTE E DENTINA**

JOÃO PAULO GOMES DE SOUZA MEIRA

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

Orientadora:

Prof^a. Dra. Patricia A. da Ana

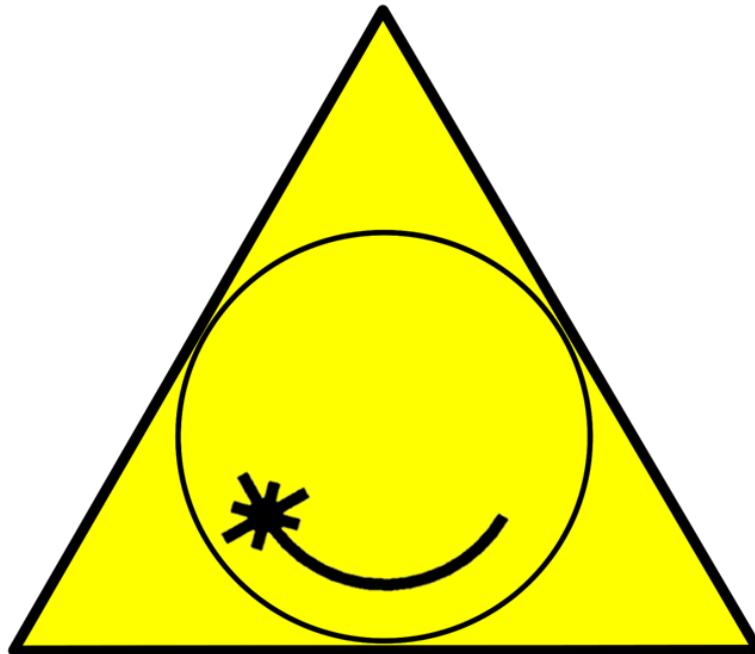
Co-orientadora:

Prof^a. Dra. Denise M. Zzell

SÃO PAULO

2010





Mestrado Profissionalizante Lasers em
Odontologia

**AÇÃO DO LASER DE Er,Cr:YSGG, QUANDO
ASSOCIADO OU NÃO AO FLÚOR TÓPICO, NA
PREVENÇÃO DA PROGRESSÃO DE LESÕES DE
CÁRIE INCIPIENTES DE ESMALTE E DENTINA**

JOÃO PAULO GOMES DE SOUZA MEIRA

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

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Patricia A. da Ana

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Denise M. Zezell

SÃO PAULO

2010

Dedicatória

A minha família, meus pais **Aurélio** e **Hilda**, e meu irmão **Joaquim Augusto** que sempre lutaram e ainda lutam para que eu siga os caminhos certos e seja uma pessoa cada vez melhor, por todo incentivo, paciência e compreensão todos estes anos, providenciais para que mais esta etapa fosse vencida.

Aos meus grandes amigos, **André Martins**, **André Hidaka**, **Antônio Marcus**, **Bernar Braga**, **Breno Braga**, **Rafael Wilson**, que de uma forma ou de outra contribuíram positivamente para a concretização deste trabalho, em especial ao **Sérgio Sizo**, por sempre ter se mostrado solícito em todos os momentos que precisei de ajuda. Muito obrigado, de coração.

Agradecimentos

À **Profa. Dra. Patrícia Aparecida da Ana**, minha orientadora, a qual tive a honra e orgulho de poder trabalhar lado a lado no desenvolvimento deste trabalho, pessoa dedicada, competente e presente em todas as etapas.

À **Prof. Dra. Denise Maria Zezell**, minha co-orientadora, por todas as vezes que me chamou atenção merecidamente, por sua competência, por ter me aberto as portas do Laboratório de Biofotônica do IPEN todas as horas que precisei.

Ao **Prof. Luis Henrique Grieco**, meu professor de cirurgia, meu grande amigo, que sempre esteve presente em minha formação desde a graduação, que me ajudou a crescer pessoalmente e profissionalmente.

Ao **Prof. Dr. Peter Shiu**, meu professor, orientador na minha graduação, colega de curso, um grande amigo que sempre pude contar com o seus sábios conselhos.

Ao **Prof. Alberto Blay**, por ter me orientado da melhor forma em minha especialização, por ter confiado a mim a indicação para a realização deste sonho de ser mestre.

Ao **Erich Tanaka**, meu sócio, amigo, irmão, por poder sempre contar com seu apoio e competência, a hora que for.

À **Lucia Fidalgo**, minha sócia, que mesmo a tão pouco tempo, se mostrou uma pessoa querida, por sua extroversão e competência.

À **Bianca Corrêa Estrela**, namorada, amiga, por ter se mostrado uma pessoa cada vez mais importante em minha vida, por todas as vezes que se

mostrou sensata e compreensiva com a minha ausência nesta etapa final do curso.

À **Maria Pastora**, amiga que esteve sempre na torcida de momentos importantes para mim.

À toda equipe que trabalha no IPEN, desde a segurança até os alunos de Mestrado e Doutorado, os quais faziam os dias de trabalho cada vez mais alegres e descontraídos no laboratório.

“Se pude enxergar mais longe, foi porque estava sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

RESUMO

Este estudo objetivou verificar os efeitos da irradiação com o *laser* Er,Cr:YSGG, quando associado ou não à aplicação tópica de flúor fosfato acidulado, na prevenção da progressão de lesões de cárie incipientes em esmalte e dentina radicular. Foram selecionados 50 dentes bovinos, dos quais foram obtidos 50 blocos de esmalte e 50 blocos de dentina radicular que foram inicialmente desmineralizados por 32 horas. As amostras, então, foram aleatoriamente distribuídas em 10 grupos (5 grupos de esmalte e 5 grupos de dentina), quando foram submetidos aos tratamentos propostos, associando-se ou não a irradiação *laser* (com densidade de energia de 8,5 J/cm² para as amostras de esmalte e 2,8 J/cm² para as amostras de dentina) à aplicação de gel de flúor fosfato acidulado. Após os tratamentos, as amostras de 4 grupos de cada substrato foram submetidas a um modelo de ciclagem de pH durante 8 dias. Para avaliação da progressão da lesão de cárie, as amostras foram submetidas à análise de microdureza seccional, e os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância e teste *post hoc* de Tukey, considerando-se 5% o nível de significância adotado. Observou-se que a irradiação *laser* promoveu redução significativa da perda de dureza de esmalte e dentina radicular, com efeitos semelhantes aos promovidos pela aplicação tópica de fluoreto em ambos os substratos. Contudo, não se observou efeitos somatórios na associação dos tratamentos quanto aos valores de perda de dureza. De acordo com os resultados obtidos e a metodologia empregada no presente estudo, concluiu-se que o *laser* de Er,Cr:YSGG reduz a perda de dureza de esmalte e dentina

radicular após o desafio cariogênico, o que confirma o seu potencial para prevenção da progressão de lesões de cárie incipientes. Ainda assim, a associação dos tratamentos promoveu maior porcentagem de inibição da progressão de lesões incipientes em relação aos tratamentos isolados.

ABSTRACT

This study aimed to verify the effects of Er,Cr:YSGG laser irradiation, irradiated or not with topical application of acidulated phosphate fluoride, on the prevention of progression of incipient caries lesions on enamel and root dentin. From 40 bovine teeth they were obtained 50 enamel and 50 root dentin slabs, which were initially demineralized for 32 hours. The samples were randomly distributed in 10 groups (5 enamel groups and 5 dentin groups); then, samples were submitted to proposed treatments, associating or not laser irradiation (with energy density of 8,5 J/cm² for enamel and 2,8 J/cm² for dentin) with topical application of acidulated phosphate fluoride gel. After treatments, the samples of 4 groups of each substrate were submitted to an 8-day pH-cycling model. For the evaluation of progression of caries lesions, the samples were submitted to cross-sectional microhardness analysis, and the results were statistically analyzed by analysis of variance and Tukey's test, at 5% significance level. It was observed that laser irradiation significantly reduced the loss of hardness of both enamel and root dentin, with similar effects that those promoted by topical application of fluoride on both substrates. However, it was not observed additional effects on the association of treatments concerning the hardness loss. According to the obtained results and the methodology used in the present study, it is possible to conclude that Er,Cr:YSGG laser irradiation reduces the loss of hardness of both enamel and root dentin, with confirms its potential to prevent the progression of incipient caries lesions. Also, the association of

treatments is able to promote higher percentage of inhibition of progression of incipient lesion when compared to the application of treatments alone.

Conteúdo

I.	INTRODUÇÃO	12
II.	OBJETIVOS	18
III.	REVISÃO DE LITERATURA	19
III.1.	Considerações sobre esmalte e dentina	19
III.2.	Etiologia e mecanismo da doença cárie.....	21
III.3.	Métodos tradicionais para prevenção da cárie.....	23
III.4.	A irradiação laser – princípios básicos	26
III.5.	A irradiação laser para prevenção da cárie.....	27
III.6.	O laser de Er,Cr:YSGG para prevenção da cárie	28
IV.	MATERIAL E MÉTODOS	30
IV.1.	Delineamento experimental	30
IV.2.	Preparo dos Espécimes	31
IV.3.	Produção da lesão de cárie inicial no esmalte e na dentina	32
IV.4.	Tratamentos investigados para inibir a progressão da lesão de cárie... 33	
IV.5.	Simulação da progressão da lesão de cárie <i>in vitro</i> por ciclagem de pH37	
IV.6.	Análise da ação anticariogênica e da perda de dureza	39
IV.7.	Análise estatística.....	42
V.	RESULTADOS	43
VI.	DISCUSSÃO	52
VII.	CONCLUSÕES.....	60
III.	APÊNDICE	61
VIII.	Referências Bibliográficas	62

I. INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença com pelo menos 500.000 anos de idade, como evidenciam os registros esqueléticos¹, sendo detectada em todos os povos, em todas as raças e em todas as épocas. Na América, a cárie incide em cerca de 95% da população, incluindo os Estados Unidos, país de elevado padrão higiênico². Assim a cárie dental constitui, inegavelmente, um sério problema social. Os avanços obtidos, quanto ao conhecimento de sua etiologia, seu diagnóstico e suas formas de tratamento e prevenção promoveram um declínio mundial na prevalência desta enfermidade, a qual representa um importante indicador da saúde de uma população³.

Etimologicamente, a palavra cárie significa material pobre. Apresenta-se como uma moléstia crônica que acomete grande parte da humanidade com certo predomínio nas áreas civilizadas¹. Logo, a cárie é um processo patológico localizado de origem externa que se inicia depois da erupção, tendo um caráter multifatorial, fortemente influenciada pelos carboidratos da dieta e pela ação dos componentes salivares^{1,4,5}. Trata-se da desmineralização dos tecidos duros pela ação dos produtos do metabolismo de bactérias cariogênicas. Este produto, em geral o ácido láctico, promove a perda de íons cálcio e fosfato, promovendo a dissolução dos cristais de hidroxiapatita nestes tecidos^{1,3,4,5}. Dentre os fatores responsáveis pelo desenvolvimento da cárie, sabe-se que os principais são: 1) a existência da placa bacteriana; 2) um substrato onde as bactérias encontram seus

nutrientes; 3) um hospedeiro susceptível; 4) o tempo de interação destes três fatores. Portanto, todos estes fatores devem existir para o desenvolvimento da doença⁵¹.

Foram propostos diferentes conceitos sobre a etiologia da cárie dentária ao longo do tempo. Em princípio, Keyes⁶ (1960) propôs que a etiologia da doença baseava-se em três fatores principais – microbiota, dente e substrato. Mais tarde, o fator tempo foi acrescentado por Newbrun⁷ em 1978, o qual evidenciou que a doença dependia de um período de desequilíbrio dos demais fatores para progredir. No entanto, atualmente se considera a doença cárie um resultado da interação dos fatores supracitados com fatores modificadores, tais como a resposta imunológica de um indivíduo e a influência do ambiente que o envolve. Ainda assim, a educação, a renda e o stress são também fatores importantes para o desenvolvimento da doença⁵¹.

Desta forma, a prevenção da cárie dentária se faz de modo eficaz, através do controle da dieta, da orientação de higiene oral e da utilização ampla de compostos fluoretados, a qual permite a efetiva redução da perda mineral do esmalte dentário íntegro, ou ativa a reposição mineral do dente com lesão de cárie, aumentando a capacidade da saliva de repor mineral no esmalte desmineralizado³.

A fluoretação das águas, a constante realização de programas de saúde, suas formas de prevenção, e o uso de dentifrícios e compostos fluoretados (bochechos, espumas, géis e vernizes) como medidas preventivas propiciaram uma queda significativas na prevalência da doença cárie em âmbito mundial^{2,8,9}. Porém, isto culminou na polarização da doença

em vários países, principalmente naqueles em desenvolvimento, de forma que 20% da população infantil concentra 60% do total de cárie¹⁰. Este fenômeno não apenas se reflete na população infantil, mais resistente ao tratamento odontológico, como também na população idosa. Em virtude do envelhecimento da população dos países desenvolvidos ou em desenvolvimento, proporcionado pela melhoria na qualidade e conseqüente aumento da expectativa de vida, torna-se maior o problema do incremento de cáries em superfícies radiculares, por causa da grande exposição destas superfícies como conseqüência da recessão gengival. Desta maneira, a cárie é considerada o principal problema de saúde bucal das pessoas com mais de 60 anos¹¹.

Considerando o que foi citado acima, somado a existência de grupos específicos de pessoas desprivilegiadas, institucionalizadas, doentes e com dificuldades de locomoção e higienização, torna-se necessário o aperfeiçoamento dos métodos preventivos já existentes, seja potencializando o efeito do flúor, aumentando o tempo de ação e exigindo menos repetições de tratamento e menores custos, ou aumentando a resistência do hospedeiro aos ácidos bacterianos, o que reduziria os riscos de sobretratamento e, com isso, os custos em logo prazo.

A irradiação com *laser* de alta intensidade tem se mostrado muito promissora neste contexto, quando aplicada isoladamente ou em associação com os métodos tradicionais, tais como a aplicação de géis e vernizes fluoretados^{12,13}. Desde a sua invenção na década de 1960, e posteriormente em suas primeiras aplicações em Odontologia¹⁴, confirmou-se que esta tecnologia poderia também possibilitar a prevenção do aparecimento das

lesões de cárie, seja tornando o substrato dental mais resistente à ação dos ácidos bacterianos ou mesmo atuando sinergicamente com o fluoreto. Desta forma, os *lasers* de Nd:YAG¹², Ho:YLF¹⁵, Argônio¹⁶, CO₂¹³, Er:YAG¹⁷ e Er,Cr:YSGG¹⁸ são constantemente avaliados quanto à possibilidade de proporcionar um aumento da resistência do esmalte e da dentina à desmineralização, quando são testados parâmetros e equipamentos para tal finalidade.

A forte interação dos *lasers* de alta intensidade com os tecidos duros dentais propiciaria um aumento significativo na temperatura superficial¹⁹, o que pode promover mudanças químicas e físicas favoráveis à redução da desmineralização, conforme já sugerido em estudos anteriores²⁰.

O *laser* de Er,Cr:YSGG (óxido de gadolínio, escândio e ítrio dopado com cromo e érbio), com comprimento de onda de emissão de 2,78 µm, mostra-se conveniente para prevenção de cárie por ter maior absorção pelo íon hidroxila constituinte da hidroxiapatita (OH⁻ mineral) do que pela água constituinte da subsuperfície (OH⁻ livre)²¹. Desta maneira, a irradiação do esmalte e da dentina com este comprimento de onda promove maiores aquecimentos teciduais, fenômeno que é favorável à indução de mudanças na microestrutura do esmalte, além de promover uma menor transmissão do calor para o interior do elemento dental²², fazendo com que os efeitos térmicos causados por ele sejam menores na polpa e nos tecidos periodontais quando comparados com os efeitos promovidos pelos *lasers* de Nd:YAG (de comprimento de onda de 1,064 µm) e CO₂ (de comprimento de onda de 9,6 e 10,6 µm).

Estudos anteriores demonstraram que o *laser* de Er,Cr:YSGG pode reduzir a dissolução de íons cálcio em ambiente ácido²³ e também exerce efeito cariostático semelhante ao uso de dentifrício fluoretado em esmalte quando empregado com densidades de energia inferiores ao limiar de ablação²⁴. Ainda assim, foi reportado que este comprimento de onda promove significativa redução da perda de dureza do esmalte quando aplicado isoladamente, assim como também exerce importante sinergia com o flúor fosfato acidulado, aumentando a formação e retenção de fluoretos de cálcio após desafio cariogênico¹⁸. Estes trabalhos foram realizados buscando-se prevenir o surgimento da lesão de mancha branca, e motivam a realização de estudos que investiguem se este *laser* pode ser efetivo na prevenção da progressão destas lesões já iniciadas, fato que ocorre com muito mais freqüência nas clínicas odontológicas. Isto poderia até mesmo resultar na paralização do processo carioso, diminuindo custos com os posteriores tratamentos curativos resultantes da posterior cavitação das lesões incipientes.

Ainda assim, considerando a alta incidência de cáries radiculares em idosos e que o *laser* de alta intensidade pode causar modificações químicas nos tecidos duros, torna-se importante avaliar se o *laser* de Er,Cr:YSGG poderia interferir na dinâmica do processo de cárie, paralizando-a, o que ainda não foi relatado na literatura.

Desta forma, pretende-se, com este trabalho, estabelecer o *laser* de Er,Cr:YSGG como um possível coadjuvante ao flúor na prevenção e controle da cárie dentária em esmalte e dentina, de tal forma que beneficiaria uma

grande parcela da população (de crianças a idosos), resultando em menores custos e maior durabilidade do tratamento preventivo proposto.

II. OBJETIVOS

O presente trabalho objetiva verificar os efeitos da irradiação com o *laser* Er,Cr:YSGG, quando associado ou não a aplicação tópica de flúor fosfato acidulado, na prevenção da progressão de lesões de cárie incipientes em esmalte e dentina, e perda de dureza seccional dos mesmos.

III. REVISÃO DE LITERATURA

III.1. Considerações sobre esmalte e dentina

O esmalte humano é composto de aproximadamente 95% de mineral, 2% de material orgânico e 3% de água^{8,41,49}. O conteúdo mineral que é constituído de cristais de hidroxiapatita fortemente unidos, separados por finos espaços inter cristalinos, os quais são preenchidos por água e material orgânico⁴. Tais espaços formam uma espécie de poro, permitindo dessa forma a passagem de íons e ácido láctico⁸.

As dimensões dos cristais de hidroxiapatita são, em média, de 50 nm de largura e mais de 100 nm de comprimento, sendo organizados repetitivamente numa quantidade aproximada de 1000 cristais, originando os prismas de esmalte⁴¹. Os cristais são circundados por uma camada de água fortemente ligada, a qual é removida somente quando há um aumento de temperatura acima de 600° C⁴².

Morfológicamente, observa-se que as dimensões dos prismas são de 5 µm x 9 µm⁴⁴, que se estende da “cabeça” até a “cauda” do mesmo⁴⁹, que vão desde a dentina até a superfície do esmalte. Observa-se, em um corte transversal que estas estruturas têm um aspecto circular e são alinhados ao longo do seu eixo paralelamente aos eixos dos primas⁷.

Em regiões como as de fóssulas, fissuras e cervicais dos dentes permanentes, ocorre a formação de uma camada aprismática, com espessura de 30 µm^{43,44}, que embora seja destituída de prismas, é

constituída por cristais de hidroxiapatita. Isto acontece, pois nem todos os cristais chegam a atingir a superfície do esmalte, os quais seguem, em geral, uma trajetória perpendicular tanto à superfície do dente quanto ao limite amelo-dentinário⁴⁴.

As várias substituições de íons na hidroxiapatita conferem um efeito importante na sua solubilidade, que depende principalmente do pH⁴¹. Além de alterar a cristalinidade e as dimensões dos cristais^{7,42}.

Dentre as substituições, a principal que ocorre se dá no íon hidroxila (OH⁻), o qual encontra-se cerca de 20% a 30% em menor quantidade no esmalte quando comparado à hidroxiapatita estequiométrica⁴¹. Já a substituição do radical fosfato (PO₄) pelo carbonato (CaCO₃), torna a hidroxiapatita mais solúvel, ao passo que a substituição das hidroxilas pelo flúor diminui o produto de solubilidade, deixando a hidroxiapatita menos solúvel^{4,7,41,42}.

O carbonato, substância que aumenta a solubilidade do esmalte, representa 3% do peso seco do esmalte^{7,42}, sendo incorporado sob forma de substituição tipo A, quando o carbonato substitui a hidroxila e a substituição tipo B, quando o carbonato substitui o fosfato, que confere uma redução no tamanho dos cristais, mudanças em sua morfologia e aumento de sua solubilidade⁴¹. Vale ressaltar que o carbonato é preferencialmente perdido durante o processo de desmineralização, sendo também excluído durante a remineralização, embora haja incorporação de magnésio, em quantidades limitadas, tendo o mesmo efeito⁸.

Os íons flúor substituem os íons hidroxila durante o processo de remineralização, originando as hidroxiapatitas fluoretadas^{4,8}. O flúor, quando

incorporado, promove um aumento no tamanho e na espessura dos cristais de hidroxiapatita, estabilizando quimicamente a mesma, e diminuindo a solubilidade^{41,42}.

III.2. Etiologia e mecanismo da doença cárie

A cárie é um processo de perda e ganho de minerais, cujo sinal clínico é evidente devido a destruição localizada dos tecidos duros afetados⁵¹. No entanto, antes da formação de cavidade no tecido acometido pela cárie, a lesão é conhecida como “lesão de mancha branca”, caracterizada pela dissolução parcial do esmalte promovida pelos ácidos no ambiente oral⁵⁰. Essa lesão por sua vez proporcionada pela perda mineral⁸, é composta por uma camada sub-superficial altamente mineralizada, com espessura aproximada de 20 a 50 µm e uma camada de perda mineral de 30 a 50% em profundidade⁵¹.

Lesões de mancha branca, podem também ser divididas em quatro zonas, que são: 1) zona translúcida (40 µm de espessura)⁴; 2) zona escura (tamanho variado) apresenta perda mineral em torno de 6%⁷; 3) o corpo da lesão apresenta uma perda mineral ao redor de 24%, sendo a maior zona da lesão⁴; 4) zona superficial (camada mais superficial), apresenta-se com espessura média de 20 a 100 µm, sendo mais espessa nas lesões inativas e mais fina nas lesões ativas⁵⁰, tendo uma porosidade que gira em torno de 1% a 2%, assemelhando-se ao tecido hígido. Tal camada persiste até o momento da cavitação⁷.

Uma vez dito que o biofilme é essencial para o desenvolvimento da doença cárie, o mesmo é formado por microorganismos que são

organizados em uma estrutura tridimensional em uma matriz de material extracelular derivado das próprias células e do ambiente. O biofilme tem seu início com a absorção de proteínas da saliva (glicoproteínas salivares, fofoproteínas), lipídeos e alguns componentes do fluido gengival⁵¹.

Esta película facilita a colonização inicial por *S.sanguinis*, *S.oralis*, *S.mitis*, *Actinomyces sp.* e bactérias Gram-negativas⁵⁰. À medida que a colonização bacteriana se torna mais espessa e a concentração de oxigênio diminui, a adesão de outras espécies de bactérias aumenta favorecendo a multiplicação de *S.mutans*, *S.sobrinus* e *Lactobacillus*, bactérias capazes de sobreviver em meios ácidos⁵⁰.

Desta maneira a retenção e a diversidade microbiana torna-se facilitada devido aos produtos do metabolismo bacteriano, a alta concentração de nutrientes, polissacarídeos, enzimas, lipídeos e minerais, logo as bactérias do biofilme tornam-se menos sensíveis aos produtos antimicrobianos⁵¹.

O biofilme é formado em áreas onde não são frequentemente submetidas aos desgastes mecânicos, como em regiões próximas a gengiva e nos sulcos e fissuras da superfície oclusal⁴⁷.

Do ponto de vista bioquímico, o desenvolvimento da lesão de cárie deve-se ao transporte e metabolismo das bactérias do biofilme, de açúcares como sacarose, frutose, maltose, lactose e álcoois de açúcar, como sorbitol e manitol, sendo convertidos em ácidos orgânicos^{6,7,51}. Tais metabolismo variam de um indivíduo para o outro, bem como a região do ambiente oral⁴⁶.

Contudo, formam-se os ácidos láctico, acético, fórmico, propiônico e butírico, além do etanol, que serão difundidos para o interior do esmalte

adjacente, quando se dissociam em íons hidrogênio (H^+), que por sua vez, podem interagir com bases presentes na saliva e bicarbonato, promovendo uma queda de pH devido o excesso de íons hidrogenio⁵⁰. Íons fosfato, carbonato e proteínas, material orgânico do biofilme e também o cálculo, quando presente, agem de forma a neutralizar o pH como sistema tampão da saliva^{4,51}. Quando o pH diminui para valores inferiores a 5,5, há a liberação de íons cálcio e fósforo da superfície do esmalte para o meio oral⁴¹.

III.3. Métodos tradicionais para prevenção da cárie

Diante dos estudos, o flúor tornou-se uma das medidas preventivas à lesões de cárie, mais eficazes. Assim como a utilização de géis, espumas, bochechos e vernizes fluoretados, os quais incorporam e retém flúor sobre os tecidos duros^{2,9,34}. Contudo, um declínio considerável na incidência de lesões de cárie, foi permitido devido a adição de flúor nas águas de abastecimento, tornando-se a medida mais efetiva no controle da doença⁵⁰. Embora haja riscos preocupantes em crianças, como a fluorose, uma vez que a administração de flúor deve ser rigorosamente controlada⁵⁰. Evitando dessa forma, o aparecimento de manchas brancas que possam confundir o diagnóstico de uma lesão inicial de cárie.

Os três principais mecanismos de atuação do flúor são⁸: 1) inibição do metabolismo bacteriano após sua difusão para o interior da bactéria, como moléculas de ácido fluorídrico; 2) inibição da desmineralização, por meio da formação de cristais tipo fluoreto de cálcio que se depositam sobre a superfície, e disponibilizam o íon fluoreto durante o desafio cariogênico; 3)

potencialização da remineralização, com a formação de apatita fluoretada ou fluorapatita sobre as superfícies remineralizadas⁵⁰. O flúor pode, também, estar absorvido no esmalte sob duas formas: flúor fracamente ligado e flúor permanentemente ligado^{7,8,51}.

O fluoreto de cálcio é formado quando há, pelo menos, 100 ppm de flúor na solução que está em contato com o esmalte⁵¹, assim como ocorre após aplicação tópica profissional de flúor e após a escovação com dentífrico contendo fluoreto de sódio (NaF). O fluoreto de cálcio não está puro sobre o esmalte, mas sim misturado com o fosfato ou proteínas salivares⁸. Logo, sua formação, é potencializada quanto maior for a concentração de fluoreto disponível, dependendo do pH do meio⁸.

Portanto, uma aplicação de flúor fosfato acidulado torna-se bastante vantajosa por disponibilizar uma concentração de fluoreto de 12300 ppm, juntamente acidificada com ácido fosfórico, levando a uma leve dissolução do esmalte superficial⁵¹.

Devido a porosidade das lesões cariosas, a precipitação de cristais tipo fluoreto de cálcio é maior, quando se trata do mecanismo chave para redução destas lesões⁵⁰. Porém, através da ação da saliva, o fluoreto de cálcio é dissolvido, diminuindo seu efeito no decorrer do tempo⁵⁰. Contudo, as aplicações tópicas de flúor devem ser repetidas freqüentemente para que se consiga modificar as propriedades do esmalte e garantir a manutenção do seu efeito⁵⁰.

Todavia, o ideal para se ter o maior efeito preventivo é quando há incorporação do fluoreto na estrutura do esmalte, através da formação de

fluorapatita, a qual é menos solúvel e apresenta-se como cristais maiores e mais estáveis quimicamente que a hidroxiapatita⁴¹.

Sabendo-se que a formação de apatitas menos solúveis, assim como a inibição de compostos fosfatados (fosfatos de cálcio) mais ácidos e mais solúveis, devem-se ao fato do fluoreto estar presente em ambiente oral, durante o desafio cariogênico, o flúor mesmo presente em baixos níveis fisiológicos (menores que 0,1 ppm) pode propiciar a formação de fluorapatita sobre a superfície das lesões^{41,50}. Fato que ocorre em faixas de pH entre 5,5 e 4,5, quando a fase aquosa adjacente ao esmalte apresenta-se não saturada com relação à hidroxiapatita e supersaturada com relação à fluorapatita⁵⁰. Desta forma, a lesão de cárie resultante apresenta uma dissolução da hidroxiapatita proveniente da região subsuperficial e a formação de fluorapatita sobre sua superfície^{8,42}.

Por outro lado, o aumento do pH propicia o redepósito de minerais sobre a superfície (formação de apatita), ao passo que a dissociação da fluorapatita ocorre com quedas maiores de pH⁵⁰.

Incorporar fluoreto nos cristais de esmalte está diretamente proporcional a ingestão de flúor durante o desenvolvimento do dente, porém não é capaz de alterar a solubilidade do mineral formado³. Tal fato justifica o motivo dos indivíduos com fluorose não serem menos susceptíveis ao desenvolvimento de lesões de cárie⁵⁰. Portanto, é importante que os íons flúor estejam ao redor dos cristais de apatita carbonatada para inibir a desmineralização⁸.

Vale ressaltar, que mesmo o flúor estando constantemente presente na cavidade oral, não é suficiente para inibir a formação de lesões cariosas,

pois ele não impede a formação da mesma, mesmo sendo o flúor uma substância a qual reduz significativamente a perda mineral, conseqüentemente a progressão das lesões³. De forma que a doença, é de uma etiologia multifatorial, deve-se considerar que a inibição do seu surgimento pode ser efetiva quando se associa a manutenção de fluoreto, há um controle da formação de biofilme, assim como o controle efetivo da dieta do indivíduo⁵⁰.

III.4. A irradiação laser – princípios básicos

A palavra *laser* é formada pelas iniciais de *light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, isto é, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, que foi descrita primeiramente por Einstein em 1917, de forma teórica⁵². Já em 1951, C.H. Townes possibilitou a aplicação desse fenômeno à amplificação de ondas ultracurtas, o MASER (*microwave amplification by stimulated emission of radiation*) e recebeu confirmação experimental em 1954⁵².

Os *lasers* se diferenciam das outras fontes luminosas convencionais por suas propriedades particulares, que são: 1) monocromaticidade, caracterizada pela emissão de fótons com mesmo comprimento de onda, isto é, fótons estimulam fótons de mesma frequência; 2) variabilidade de potência, ou seja, para o mesmo comprimento de onda é possível ter diferentes potências de saída; 3) coerência, sendo a medida da correlação entre as fases medidas em diferentes pontos de uma onda; 4) pouca divergência, ou seja, o feixe é colimado, tornando a luz emergente do *laser* paralela com pequena divergência a uma relativa distância⁵².

Dentre os tipos de emissão ou regime de operação dos *lasers*, os mesmos podem comportar-se de formas muito diferentes em função do tempo. Os *lasers* de emissão contínua têm potência de saída constante durante todo tempo, enquanto que os *lasers* de emissão pulsada têm potência de saída oscilante, que varia entre um valor máximo (potência pico) e zero durante um determinado período de tempo⁵².

Assim como as características dos *lasers*, o tipo de emissão ou regime de operação, existem também os sistemas de entrega do feixe, que, sobretudo, são quatro: 1) fibra óptica, permitindo contato com o tecido; 2) guia de onda oco, consistindo de tubos flexíveis com superfície interna refletora; 3) braço articulado, havendo espelhos localizados nos “cotovelos” do braço e que direcionam o feixe ao longo do mesmo; 4) endoscópio, podendo ser acoplado a um microscópio⁵².

III.5. A irradiação laser para prevenção da cárie

Considerando a aplicação tópica de flúor fosfato acidulado a medida mais efetiva da prevenção e controle de lesões cáries, e sabendo-se que o mesmo deve ser mantido em ambiente oral⁴⁷, torna-se necessário o uso de outros métodos que venham a somar com os métodos já consagrados, no que diz respeito ao aumento da resistência do esmalte e da dentina, bem como a potencialização de seu efeito, tentando prolongar a sua ação por mais tempo.

Stern e Sognaes, na década de 60, evidenciaram uma maior resistência do esmalte aos ácidos por meio da irradiação com *laser* de rubi, com comprimento de onda de 693 nm, e desde então o uso dos *lasers* em

Odontologia vem sendo intensamente pesquisados^{14,36}. Bem como a constante busca por parâmetros e comprimento de onda adequados às diversas aplicações clínicas possibilitou o melhor entendimento da interação da irradiação *laser* com os tecidos dentais duros, tornando-se hoje, uma ferramenta coadjuvante para a maioria das intervenções odontológicas⁵⁰. Dentre os parâmetros necessários para melhor utilização dessa tecnologia para cada tecido, estão o comprimento de onda, modo de emissão (contínuo ou pulsado), duração do pulso, energia por pulso, taxa de repetição, fluência (densidade de energia), diâmetro do feixe e características do feixe⁵².

Sendo considerados os parâmetros supracitados e as propriedades de cada tecido irradiado, a irradiação *laser* poderá ser absorvida, espalhada ou mesmo transmitida para o interior do tecido⁵². Uma vez que, para que haja alterações químicas no tecido, é necessário que a irradiação *laser* seja absorvida pelo tecido para promover um aumento de temperatura, porém restrita a pequena profundidade³⁸.

Logo, podemos observar no gráfico abaixo que os *lasers* de érbio e CO₂ têm a melhor interação com os componentes estruturais do esmalte e da dentina. Sendo que o aumento da temperatura na superfície do tecido proveniente das irradiações, mostra-se como o principal fator responsável nas alterações da microestrutura dos substratos (esmalte e dentina)^{20,37,38,39,40}.

III.6. O laser de Er,Cr:YSGG para prevenção da cárie

Vários comprimentos de onda foram empregados na tentativa de tornar o esmalte dental mais resistente à desmineralização, conforme foi

relatado anteriormente, quando resultados promissores foram obtidos principalmente na utilização dos *lasers* de Nd:YAG (1,064 μm) e CO₂ (9,6 e 10,6 μm)⁵⁰. Ainda assim o *laser* de Nd:YAG, o qual oferece uma grande resistência ao esmalte dental em virtude de sua pouca absorção pelo tecido e grande transmissão, aumenta o risco de danos pulpares. No entanto, o *laser* de CO₂ (9,6 μm) apresenta excelentes resultados quando a indução de resistência à desmineralização e na redução da progressão da lesão de cárie, porém com a limitação de não serem ainda comercializados para uso odontológico⁵⁰.

O *laser* de Er,Cr:YSGG (óxido de gálio, escândio, e ítrio dopado com érbio e cromo), com comprimento de onda de 2,79 μm , vem sendo indicado principalmente para remoção de tecidual por meio de ablação (efeito fotoacústico)^{53,54,55,56}. Este mecanismo da ablação semelhante ao que acontece com o *laser* de Er:YAG possui uma forte interação com a hidroxila (OH⁻) da água, já o *laser* de Er,Cr:YSGG tem interação tanto pela água como também pela hidroxila presente na hidroxiapatita (OH⁻ mineral)^{21,54}, principal motivo pelo qual o este *laser* promove maior aquecimento superficial quando comparado com o *laser* de Er:YAG, chegando inclusive a fundir o tecido irradiado sob determinadas condições de irradiação⁵⁷. Contudo, visto que o aquecimento superficial é um dos requisitos para promover modificações da micro-estrutura do esmalte e da dentina, o *laser* de Er,Cr:YSGG torna-se um fortemente um candidato para o uso preventivo da cárie⁵⁰.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

IV.1. Delineamento experimental

Para realização do presente estudo *in vitro* cego, foram selecionados 50 dentes bovinos, dos quais foram obtidos 50 blocos de esmalte e 50 blocos de dentina radicular. Esses blocos foram inicialmente desmineralizados durante 32 horas. Então, as amostras foram divididas aleatoriamente em 10 grupos (5 grupos de esmalte e 5 grupos de dentina) de 10 blocos cada, quando foram submetidas aos tratamentos propostos, associando-se ou não a irradiação *laser* posterior ou antes à aplicação de gel de flúor fosfato acidulado (FFA). Após os tratamentos, 1 grupo de esmalte e grupo de dentina foram destinados diretamente à análise de microdureza seccional para a obtenção dos valores de perda de dureza iniciais (controle). As demais amostras foram submetidas ao desafio cariogênico *in vitro*, por meio da ciclagem de pH durante 8 dias. Para avaliação da progressão da lesão de cárie, as amostras foram submetidas à análise de microdureza seccional para analisar a perda de dureza das amostras e a porcentagem de inibição de formação de lesão de cárie referente a cada tratamento, permitindo, assim, a avaliação dos efeitos dos diferentes tratamentos sobre a dinâmica da cárie. Desta maneira, a presença ou não da irradiação *laser*, assim como sua associação ou não com o FFA foram considerados os fatores de estudo, tendo, como unidades experimentais, os blocos de esmalte e dentina. A variável resposta foi a

perda de microdureza. Os resultados obtidos foram analisados por análise de variância e teste de Tukey, considerando-se 5% o nível de significância adotado.

IV.2. Preparo dos Espécimes

Foram selecionados 50 dentes incisivos bovinos, clinicamente hígidos e com esmalte íntegro, os quais foram obtidos todos ao mesmo tempo e mantidos em solução de formaldeído a 2% em pH 7,0 sob refrigeração a 4° C até o início dos procedimentos.

Todos os dentes tiveram seus restos pulpares removidos com limas endodônticas e foram lavados com água e sabão e limpos por meio de profilaxia com pedra-pomes (SS White Brasil), água destilada e deionizada e escova tipo *Robinson* em baixa rotação por 30 segundos. Depois de enxaguados com água destilada e deionizada e secos com jato de ar comprimido, os dentes foram observados em lupa estereoscópica (10X) para visualização de eventuais trincas ou irregularidades. Os que continham qualquer defeito estrutural foram excluídos.

A partir da superfície vestibular de cada dente, foi obtido um bloco de esmalte, com dimensões de 2 x 4 x 2 mm, por meio de seccionamento com disco diamantado sob refrigeração (Accuton 2, Struers, UK). Os blocos de dentina radicular de 2 x 4 x 2 mm foram obtidos por seccionamento da região cervical das raízes dos mesmos dentes²⁵. Os blocos assim obtidos foram novamente submetidos à profilaxia, para remoção de eventuais resíduos de cera.

Para delimitação da área da lesão de cárie, as superfícies laterais das amostras foram recobertas com duas camadas de esmalte ácido-resistente (esmalte de unha) de cores fortes, facilitando a visualização de eventuais bolhas na aplicação do mesmo. Logo após, as amostras foram casualmente divididas (n=10) entre os 10 grupos propostos e mantidas individualizadas em frascos hermeticamente fechados em ambiente úmido sob refrigeração a +4° C, com algodão estéril umedecido com água destilada e deionizada, até o momento dos tratamentos.

IV.3. Produção da lesão de cárie inicial no esmalte e na dentina

Para produzir a lesão de cárie subsuperficial inicial, sem haver perda estrutural da superfície, cada amostra foi mantida individualmente em solução desmializadora (2mL de solução/mm² de substrato exposto) durante 32 horas a 37° C, de acordo com o protocolo estabelecido por Queiroz (2004)²⁵. As amostras de esmalte foram imersas em soluções desmineralizadoras de composição diferente das destinadas para a desmineralização de dentina, conforme será descrito na Figura 1, em tubos tipo *Falcon* individualizadas e identificadas.

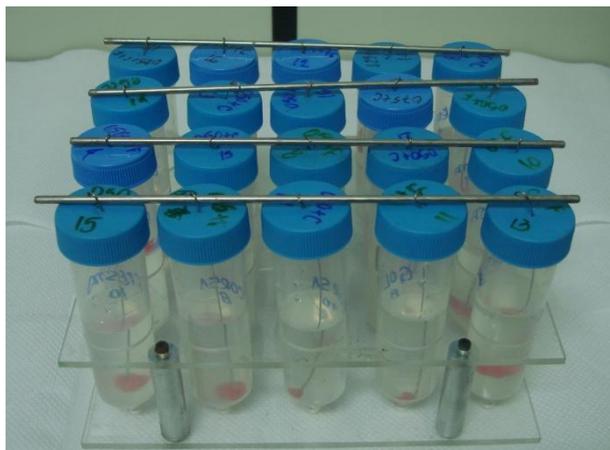


Figura 1 – Imersão das amostras em tubos *Falcon* individualizados para produção de cárie subsuperficial inicial.

IV.4. Tratamentos investigados para inibir a progressão da lesão de cárie

Após a desmineralização das amostras, as mesmas foram divididas aleatoriamente em dez grupos para tratamento (n=10), considerando-se quatro cinco para esmalte e cinco grupos para dentina, conforme a Tabela 1.

Nos grupos 3, 5, 8 e 10, foi empregado gel de flúor fosfato acidulado (Flúor Gel, Dentsply, Brasil, 1,23% de flúor, pH 3,6 – 3,9) como mostra a Figura 2, que permaneceu sobre as superfícies das amostras durante 4 minutos²⁶. Decorrido este tempo, os blocos foram lavados com água destilada e deionizada por 1 minuto e secos com papel absorvente.



Figura 2: Flúor fosfato acidulado empregado no presente estudo.

Nos grupos 4, 5, 9 e 10, as amostras foram irradiadas com *laser* Er,Cr:YSGG, cuja emissão se dá por meio de uma fibra óptica flexível de 750 μm de diâmetro terminada por uma ponta de cristal de safira banhada por um spray de ar/água ajustável (Millenium, Biolase Technology, Inc., San Clemente, CA). Este *laser* emite no comprimento de onda de 2,79 μm , com pulsos variando entre 140 a 200 μs , 20 Hz de taxa de repetição e potência que varia de 0 a 6 W. O equipamento utilizado pertence ao Laboratório de Biofotônica, do Centro de *Lasers* e Aplicações do IPEN/CNEN-SP (Projeto CEPID FAPESP n°. 98/14270-8).

Tabela 1: Grupos de tratamento propostos para o presente estudo.

Grupo	Substrato	Tratamento	Especificações
1	Esmalte n=5	Sem tratamento	Não submetido à ciclagem de pH (grupo controle de cárie)
2	Esmalte n=5	Sem tratamento	-
3	Esmalte n=5	Aplicação de flúor fosfato acidulado (FFA)	Flúor Gel, Dentsply, Brasil, 1,23% F ⁻
4	Esmalte n=5	Irradiação com <i>laser</i> de Er,Cr:YSGG com densidade de energia de 8,5 J/cm ²	P _{media} = 0,75W, 32,5 mJ/pulso, sem refrigeração, varredura.
5	Esmalte n=5	Aplicação de FFA antes da irradiação com <i>laser</i> de Er,Cr:YSGG com densidade de energia de 8,5 J/cm ²	Idem grupos 3 e 4
6	Dentina n=5	Sem tratamento	Não submetido à ciclagem de pH (grupo controle de cárie)
7	Dentina n=5	Sem tratamento	-
8	Dentina n=5	Aplicação de flúor fosfato acidulado (FFA)	Flúor Gel, Dentsply, Brasil, 1,23% F ⁻
9	Dentina n=5	Irradiação com <i>laser</i> de Er,Cr:YSGG com densidade de energia de 2,8 J/cm ²	P _{media} = 0,25W, 12,5mJ/pulso, sem refrigeração, varredura.
10	Dentina n=5	Aplicação de FFA antes da irradiação com <i>laser</i> de Er,Cr:YSGG com densidade de energia de 2,8 J/cm ²	Idem grupos 7 e 8

Para as irradiações do presente estudo, foi utilizada a ponta tipo **S75**, de diâmetro de 750 µm e comprimento de 6 mm, originando um tamanho de feixe de 600 µm quando posicionado a 1 mm de distancia entre a ponta de

safira e a superfície dental. Tal ponta foi selecionada por não promover perda do feixe *laser*¹⁸ (Figura 3).

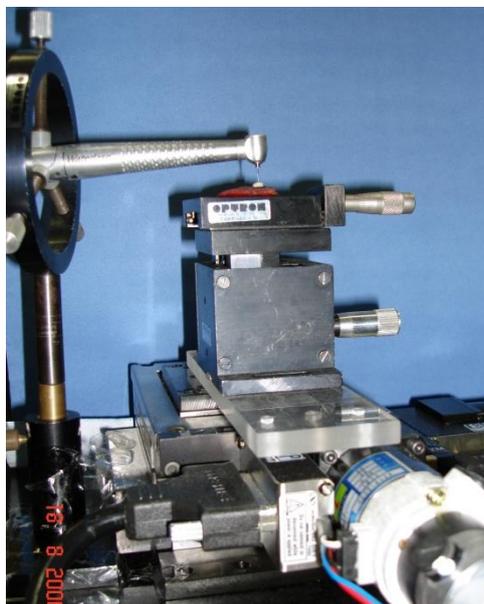


Figura 3 – Posicionamento da amostra e da fibra do laser de Er,Cr:YSGG em suportes ópticos e deslocador micrométrico X-Y para padronizar as irradiações.

Para irradiação, as amostras foram posicionadas individualmente em um deslocador micrométrico automático de passo X-Y-Z (ESP 300, Newport, CA, USA), de forma que as amostras foram deslocadas durante as irradiações com velocidade padronizada de 4 mm/s e distâncias entre linhas padronizadas de 400 μm , evitando-se os eventuais “espaços” entre os pulsos da irradiação *laser*¹⁸. Durante as irradiações, a fibra óptica foi posicionada e mantida estável em suportes ópticos, a 1 mm de distância da superfície das amostras (Figura 4).

A densidade de energia empregada foi de $8,5 \text{ J/cm}^2$ para esmalte (potência média de $0,75 \text{ W}$, $32,5 \text{ mJ/pulso}$, sem refrigeração) e de $2,8 \text{ J/cm}^2$ para dentina (potência média de $0,25 \text{ W}$, $12,5 \text{ mJ/pulso}$). No momento das irradiações, a energia emitida foi verificada por um medidor de energia (FieldMaster, Coherent, USA) a cada três amostras¹⁸.

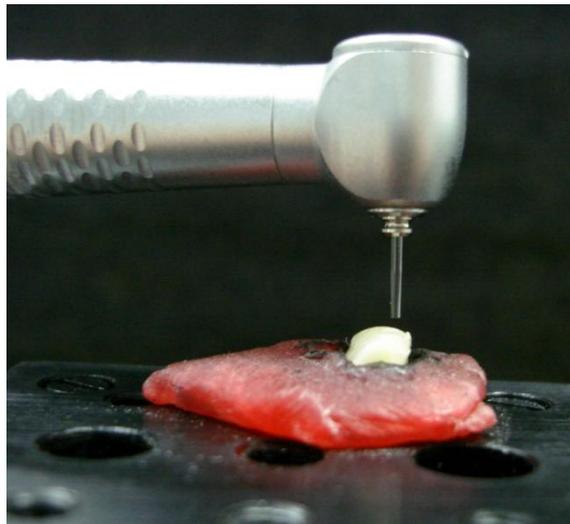


Figura 4 – Irradiações efetuadas com distância ponta de safira-amostra padronizada em 1 mm.

IV.5. Simulação da progressão da lesão de cárie *in vitro* por ciclagem de pH

Após os tratamentos, as amostras foram posicionadas individualmente em hastes metálicas confeccionadas de fios ortodônticos de $0,8 \text{ mm}$ de diâmetro, com certa tipo 7. Estas hastes, juntamente com as

amostras, foram presas nas tampas de tubos tipo *Falcon* de 50 mL estéreis, individualizadas e identificados, para possibilitar a simulação do processo de cárie *in vitro*.

As amostras dos grupos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, e 10 foram individualmente submetidas a um modelo de ciclagem de pH conforme modelo proposto por Ten Cate & Duijsters (1982)²⁷, modificado por Queiroz (2004)²⁵. Foram realizados 8 dias de ciclagem, consistindo na submersão dos blocos em uma solução desmineralizadora por um período de 4 horas (6,25 mL/mm² de amostra), para posterior submersão em uma solução remineralizadora por um período subsequente de 20 horas (3,12 mL/mm² de amostra). Depois de cada ciclo, as amostras retornaram às mesmas soluções e, no 4^o dia de ciclagem, as soluções foram trocadas visando-se evitar a saturação iônica de fluoreto (Figura 5).

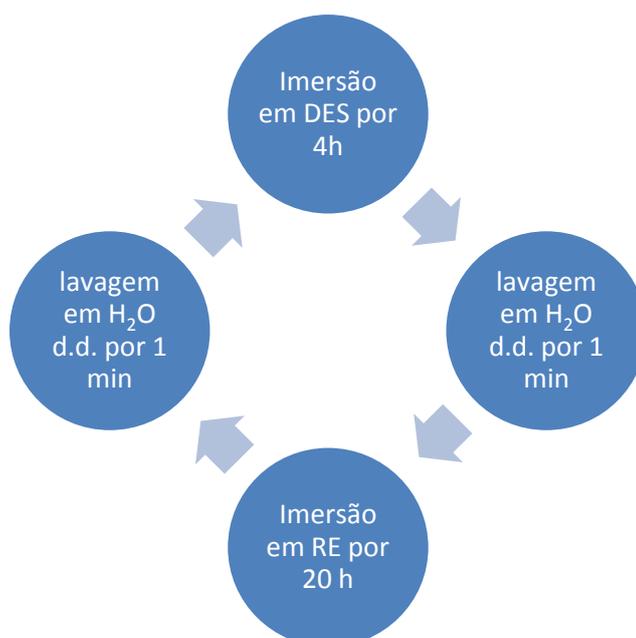


Figura 5 – Esquema da ciclagem de pH empregada no presente estudo, de acordo com o protocolo estabelecido por Queiroz (2004)²⁵.

Para a indução da lesão de cárie em esmalte, a solução desmineralizadora foi constituída de 1,28 mM de cálcio, 0,74 mM de fosfato e 0,03 $\mu\text{g F}^-/\text{mL}$ em tampão acetato 0,05 com pH 5,0, sendo a solução remineralizadora constituída de 1,5 mM de cálcio, 0,9 mM de fosfato, 150 mM de KCl e 0,05 $\mu\text{g F}^-/\text{mL}$ em 0,1 M de tampão Tris em pH 7,0. Para a indução de cárie em dentina, a solução desmineralizadora foi constituída de 1,4 mM de cálcio, 0,91 mM de fosfato e 0,06 $\mu\text{g F}^-/\text{mL}$, em tampão acetato 0,05 M com pH 5,0, sendo a solução remineralizadora constituída de 1,5 mM de cálcio, 0,9 mM de fosfato, 150 mM de KCl e 0,05 $\mu\text{g F}^-/\text{mL}$ em 0,1 M de tampão Tris em pH 7,0.

Toda a ciclagem foi realizada com as amostras mantidas em temperatura controlada de 37° C, exceto nos intervalos de lavagem e alternância das soluções. Terminada a ciclagem de pH, as amostras foram lavadas com jatos de água destilada e deionizada durante 10 segundos, secas com papel absorvente e mantidas em ambiente fechada, úmido e sob refrigeração, até o preparo para leitura de microdureza seccional.

IV.6. Análise da ação anticariogênica e da perda de dureza

Para verificar os efeitos dos diversos tratamentos na inibição da progressão da lesão de cárie, todas as amostras foram submetidas à análise

da perda de dureza, por meio do teste de microdureza seccional. Após a ciclagem de pH, as amostras foram seccionadas longitudinalmente, utilizando o disco diamantado sob refrigeração em baixa rotação (Accutom 2, Struers, UK), com um corte localizado próximo a uma das bordas das lesões buscando-se preservar a integridade das lesões o máximo possível¹⁸.

Em seguida, as lesões seccionadas foram embutidas em resina acrílica termicamente ativada (Vipi Cril, Brasil), com face seccionada voltada para baixo, com auxílio de embutidora (Arotec, Brasil), o que permitiu com que as faces da resina ficassem paralelas e, assim, facilitaria a análise por microdureza. As amostras assim embutidas foram planificadas e polidas, utilizando-se lixas de granulação 400, 600 e 1200 (Buehler, USA), assim com pasta de plimento de granulação de 1 μm e disco de feltro (Buehler, USA)²⁵.

Após o polimento, as amostras foram submetidas à análise de microdureza seccional Knoop utilizando-se o microdurômetro HMV 2T (Shimadzu Scientific Instruments, Japão), pertencente ao Laboratório de Biofotônica de Centro de *Lasers* e Aplicações do IPEN/CNEN-SP. Em cada amostra, foram realizadas três linhas de 14 indentações, com 10 μm de distância entre as indentações (até 80 μm de profundidade) e com 20 μm de distância entre as indentações até 200 μm de profundidade. Entre as linhas, a distância padronizada foi de 100 μm , sendo todas as indentações realizadas com carga de 25 g durante 5 segundos nas amostras de esmalte e 10 g durante 5 segundos nas amostras de dentina²⁵.

Os dados obtidos foram transportados para planilhas (Microsoft Excel), onde foram calculadas as médias dos valores obtidos para, a partir

destes dados, calcular-se o parâmetro Delta S (ΔS), corresponde à área de perda de dureza das amostras, conforme figura a seguir.

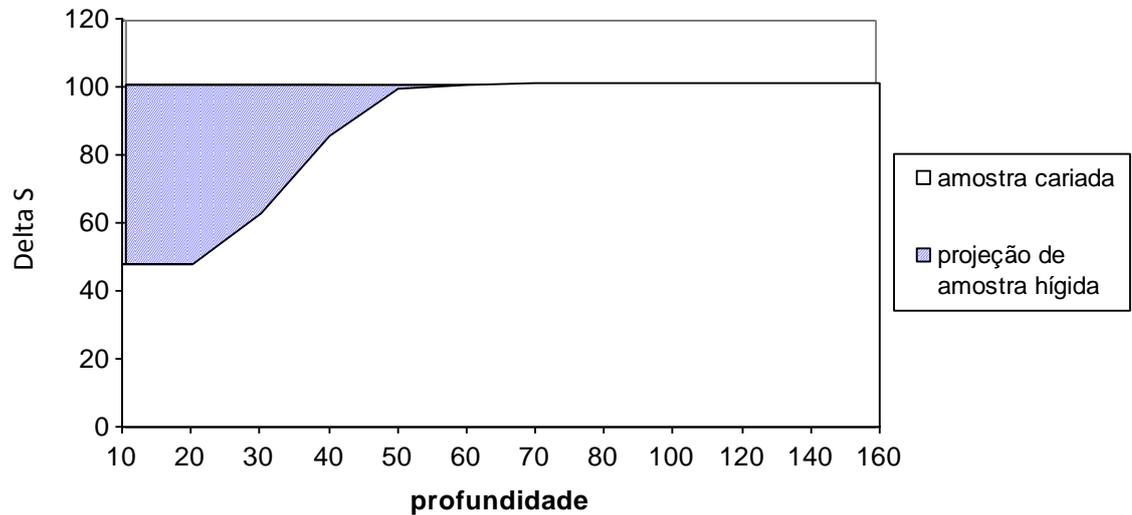


Figura 6 - Ilustração do parâmetro Delta S (ΔS), correspondente à diferença da área da projeção de cada amostra hígida e a área da amostra cariada.

Adicionalmente, a porcentagem de inibição da progressão de cárie foi calculada para todos os grupos (de esmalte e de dentina, correlacionando-se com seus respectivos controles), utilizando-se a média ΔS , por meio da equação:

$$\% \text{ de Inibição} = \frac{(\Delta S \text{ Controle} - \Delta S \text{ Cariado}) - (\Delta S \text{ Tratamento} - \Delta S \text{ Cariado})}{(\Delta S \text{ Controle} - \Delta S \text{ Cariado})} \times 100$$

IV.7. Análise estatística

Para a realização da análise estatística deste estudo, foram considerados dois grupos distintos de amostras – esmalte e dentina, tendo em vista as diferenças inerentes a cada tecido (composição química e cristalina, taxa de progressão de cárie, etc) que impossibilitariam a comparação direta dos efeitos neles ocorridos.

Em um primeiro momento, os pressupostos para realização da Análise de Variância (ANOVA), isto é, independência, normalidade e homogeneidade, foram testados empregando-se os testes estatísticos de Levene e Shapiro-Wilk, ao nível de significância de 5%, para cada tecido dental.

Como os dados deste trabalho encontravam-se dentro destes pressupostos, foi efetuada a análise de variância de um fator único com repetições, independente para cada substrato testado, complementada com o teste *post hoc* de Tukey para contrastes, também se considerando 5% o nível de significância.

Para a realização das análises, foi empregado o software Biostat 5.0. Considerou-se, como unidades experimentais, os blocos de esmalte e dentina; como fatores em estudo, os tratamentos e, com variável resposta, a perda de dureza.

V. RESULTADOS

A apresentação dos resultados obtidos neste trabalho será efetuada separadamente para cada um dos tecidos dentais testados, respeitando as particularidades inerentes aos substratos em questão.

A Tabela 2 descreve os valores médios obtidos de Delta S para cada grupo de tratamento considerando-se o substrato esmalte, assim como seus respectivos desvios-padrão. Nesta tabela, também é possível evidenciar a porcentagem de inibição da progressão da lesão de cárie referente a cada tratamento proposto.

Tabela 2 - Média e desvio padrão ($M \pm D.P.$, $n=10$) da perda de dureza (Delta S) e porcentagem de inibição (%) da progressão de cárie no esmalte dental bovino cariado após ciclagem de pH.

Grupo	Delta S \pm D.P.	% inibição da progressão da lesão
Cárie inicial	3996,42 \pm 2105,90 ^b	-
Controle (sem tratamento)	12430,02 \pm 5908,20 ^a	-
FFA	5373,65 \pm 1367,58 ^b	65 %
Laser	5794,22 \pm 2893,89 ^b	55 %
FFA + Laser	4913,80 \pm 1021,74 ^b	77 %

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Observando esta tabela, e considerando-se a análise estatística efetuada (ANOVA + Tukey), pode-se observar que houve progressão de cárie em todos os grupos experimentais do presente estudo, isto é, os valores de Delta S após a ciclagem de pH são maiores do que o valor de Delta S inicial. Assim, infere-se que nenhum dos tratamentos propostos impediu completamente a progressão das lesões incipientes de cárie. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os valores de Delta S dos grupos tratados com FFA, somente laser e FFA + laser quando comparados ao valor de Delta S encontrado para a lesão de cárie inicial. Este fenômeno indica que todos os tratamentos propostos foram capazes de inibir significativamente a progressão das lesões de cárie incipientes, não alterando ou alterando muito pouco os valores de perda de dureza destas lesões. Ressalta-se, ainda assim, que o valor da perda de dureza do grupo sem tratamento é significativamente maior quando comparado aos demais grupos tratados ($p < 0,05$), indicando que houve progressão de lesão de cárie significativamente maior neste grupo.

A Figura 7 ilustra os valores médios de Delta S para cada grupo experimental de esmalte, assim como seus respectivos erros-padrão.

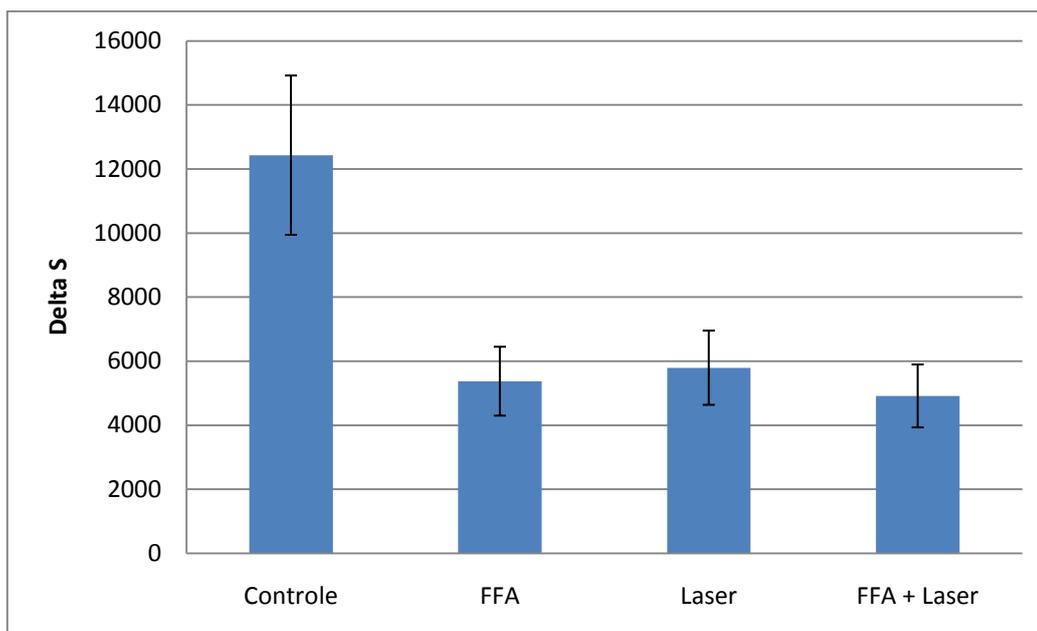


Figura 7 - Valores de Delta S obtidos para os diferentes grupos de tratamento propostos, considerando a inibição da progressão das lesões de mancha branca em esmalte dental bovino. As barras correspondem ao erro padrão.

Por esta figura, é possível inferir que a irradiação do esmalte cariado com *laser* de Er,Cr:YSGG a $8,5 \text{ J/cm}^2$ foi capaz de reduzir significativamente a progressão das lesões de cárie na superfície do esmalte, de forma a inibir a progressão da lesão incipiente de cárie em 55 % (Tabela 2). Isto demonstra o efeito isolado da irradiação *laser* na progressão da lesão de cárie, de forma muito similar ao efeito promovido pela aplicação isolada de flúor fosfato acidulado, o qual resultou em 65% de inibição da progressão da lesão incipiente em esmalte (Tabela 2). Maiores efeitos na redução da perda de dureza são observados no grupo FFA + *laser*, os quais promoveram significativa redução quando comparado ao grupo controle (77% de inibição da progressão da lesão), embora não tenha sido evidenciada diferença

estatisticamente significativa na comparação com os grupos FFA e *laser* ($p < 0,05$).

A Figura 8 ilustra a ação dos diferentes tratamentos na perda de dureza das amostras em relação à profundidade das mesmas. Por esta figura, pode-se evidenciar que todos os tratamentos propostos reduziram a perda de dureza em profundidade em comparação com o grupo sem tratamento. Os efeitos, contudo, foram mais pronunciados quando a irradiação laser foi associada à aplicação de flúor fosfato acidulado (grupo FFA + laser), o qual reduziu significativamente a perda de dureza das amostras a partir de 10 μm de profundidade. Por esta figura, também pode ser inferido que os tratamentos propostos reduziram a profundidade média das lesões de cárie incipiente quando comparados ao grupo controle, de forma que as lesões de cárie formadas nestes grupos sofreram progressão até, aproximadamente, 110 μm de profundidade, enquanto que, no grupo controle, as lesões apresentaram média de 150 μm de profundidade.

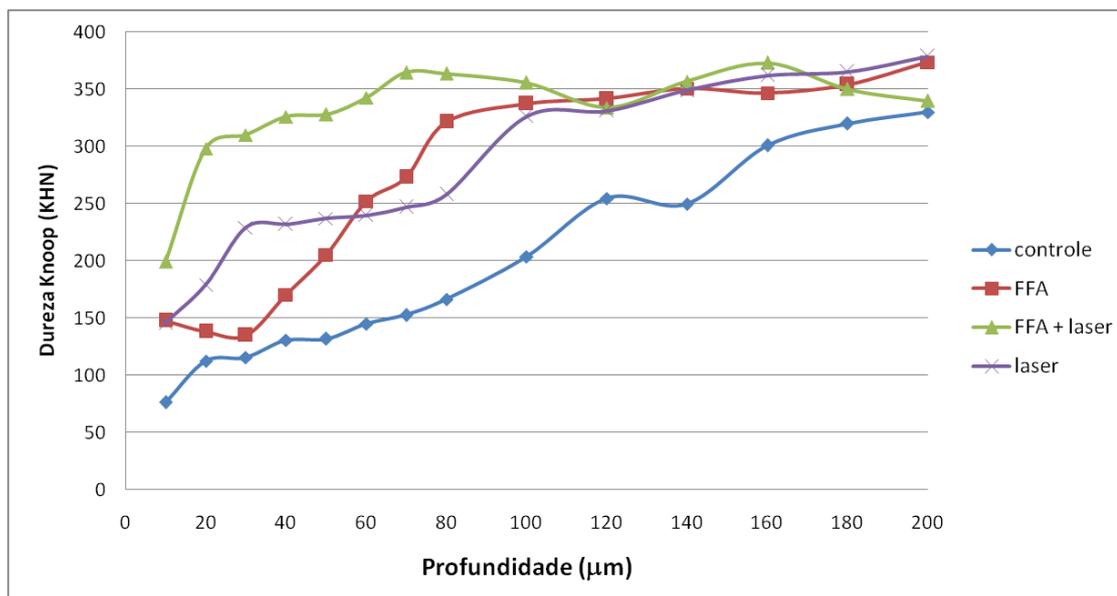


Figura 8 – Curvas representativas das médias de perda de dureza Knoop (KHN) dos diferentes grupos experimentais do presente trabalho para tratamento de esmalte, em relação à profundidade (µm). KHN = *Knoop hardness number*.

A Tabela 3 evidencia os valores médios de Delta S, com seus respectivos desvios-padrão, obtidos para cada grupo de tratamento considerando o substrato dentina radicular. Nesta tabela também se observa a porcentagem média de inibição da progressão da lesão de cárie em dentina radicular decorrente dos diferentes tratamentos propostos.

Tabela 3 - Média e desvio padrão (n=10) da perda de dureza (Delta S) e porcentagem de inibição (%) da progressão de cárie na dentina radicular bovina cariada após ciclagem de pH.

Grupo	Delta S ± D.P.	% inibição da progressão da lesão
Cárie inicial	406,27 ± 213,20 ^b	-
Controle (sem tratamento)	879,31 ± 457,33 ^a	-
FFA	528,45 ± 293,43 ^b	70 %
Laser	594,35 ± 323,07 ^b	53,8 %
FFA + Laser	451,99 ± 240,58 ^b	88 %

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Por esta tabela, também é possível observar que houve progressão de lesão de cárie em todos os grupos testados, de forma semelhante ao ocorrido com o substrato esmalte, evidenciando que nenhum dos tratamentos propostos foi capaz de paralisar a atividade da lesão de cárie. Contudo, a progressão da lesão foi significativamente maior no grupo sem tratamento ($p < 0,05$), indicando que todos os tratamentos propostos foram efetivos na inibição da progressão da lesão. De fato, o grupo com aplicação tópica de FFA promoveu 70% de inibição da progressão da lesão de mancha branca *in vitro*, enquanto que a irradiação laser, mesmo sob densidades de energia bem inferiores à empregada em esmalte (2,8 J/cm²), promoveu

cerca de 54% de inibição. Estes valores refletem os efeitos isolados destes tratamentos, demonstrando sua efetividade na inibição das lesões incipientes também em dentina radicular.

A associação FFA e *laser* de Er,Cr:YSGG foi o tratamento que promoveu efeito mais significativo na perda de dureza, de forma que apresentou 88% de inibição da perda de dureza. Contudo, os valores obtidos não diferem estatisticamente entre os diversos tratamentos avaliados, de forma que é possível sugerir que, em curto período de tempo, não ocorrem efeitos somatórios da irradiação *laser* com a aplicação tópica de flúor fosfato acidulado.

A Figura 9 ilustra os valores de Delta S referentes aos diferentes tratamentos propostos em dentina radicular, com as respectivas barras de erro padrão. Por esta figura, é possível visualizar os efeitos significativos dos tratamentos isolados (FFA ou irradiação *laser*) sobre a perda de dureza em relação ao grupo sem tratamento; contudo, não se observam efeitos somatórios destes tratamentos na redução do Delta S.

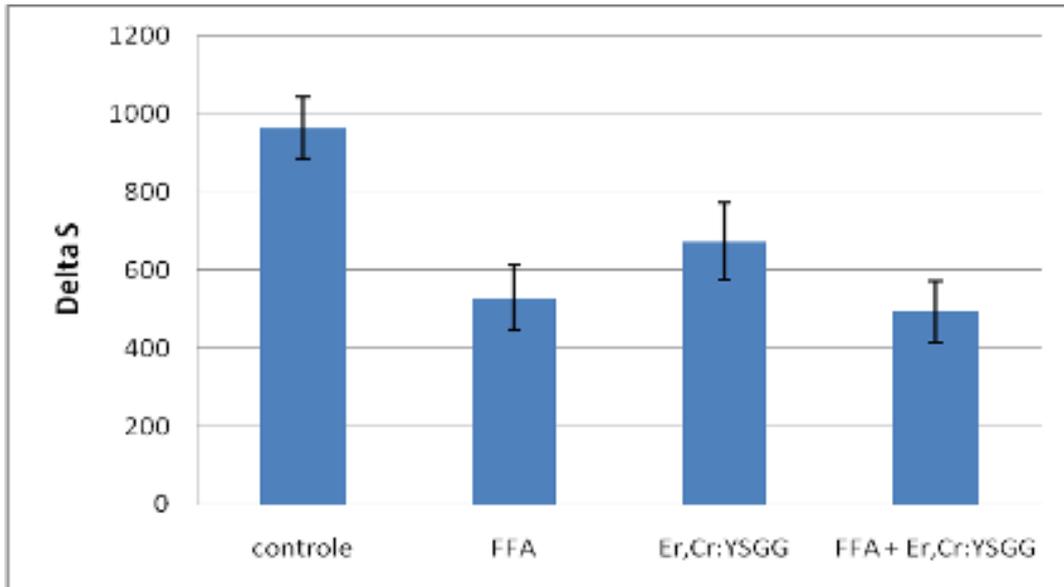


Figura 9 - Valores de Delta S obtidos para os diferentes grupos de tratamento propostos, considerando a inibição da progressão das lesões de mancha branca em dentina radicular bovina. As barras significam erro padrão.

A Figura 10 ilustra a ação dos diferentes tratamentos na perda de dureza das amostras de dentina radicular em relação à profundidade das mesmas.

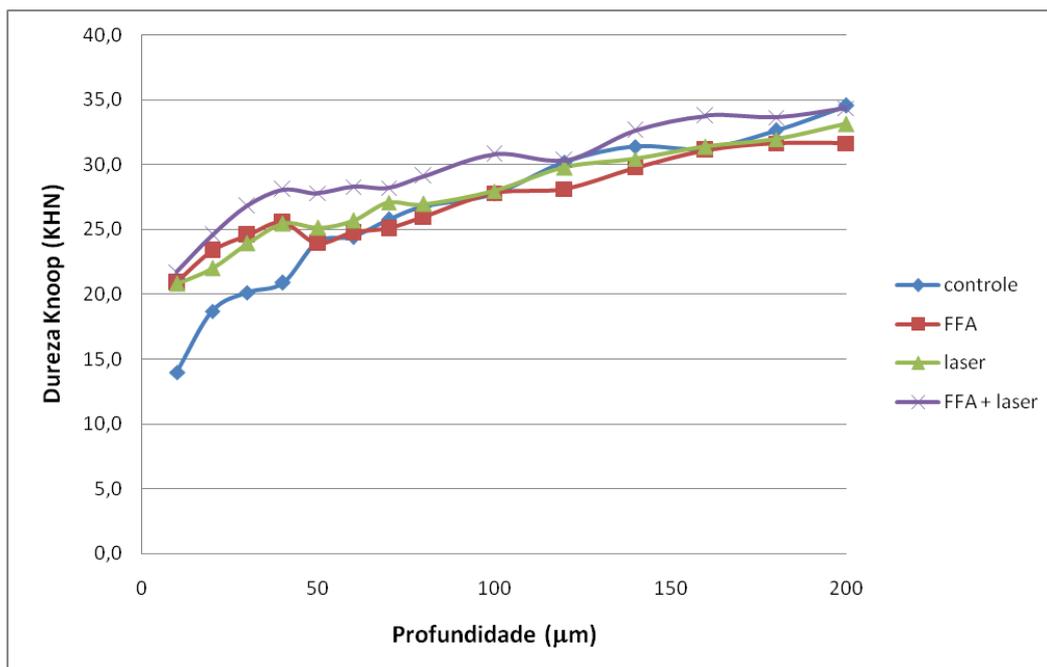


Figura 10 - Curvas representativas das médias de perda de dureza Knoop (KHN) dos diferentes grupos experimentais do presente trabalho para tratamento de dentina radicular, em relação à profundidade (μm). KHN = *Knoop hardness number*.

Nesta figura evidencia-se que todos os tratamentos propostos reduziram a perda de dureza em comparação com o grupo sem tratamento até, aproximadamente, 50 μm de profundidade. A partir desta profundidade, os grupos de tratamentos isolados (grupo FFA ou grupo laser) não exerceram efeitos significativos sobre a perda de dureza Knoop. Contudo, maiores efeitos foram observados quando a irradiação laser foi associada à aplicação de flúor fosfato acidulado (grupo FFA + laser), o qual reduziu significativamente a perda de dureza das amostras até uma profundidade média de 110 μm .

VI. DISCUSSÃO

Embora tenha sido reportado na literatura um intenso declínio na incidência de lesões de cárie^{2,3,9,10}, fenômenos como a alta polarização da doença principalmente nos países subdesenvolvidos requerem a aplicação de métodos preventivos mais eficazes, isto é, que exijam menos repetições e que atuem por maior período de tempo, tendo em vista que, nestes países, fatores como nível socioeconômico e cultural muitas vezes impedem o acesso aos tratamentos odontológicos curativos e preventivos. Desta forma, para as pessoas que vivem em regiões afastadas, carentes de atenção odontológica periódica, tratamentos mais duradouros refletiriam em maiores benefícios, não somente para os pacientes em si, como também para o sistema público de saúde, o qual investiria menores recursos em tratamentos curativos, muitas vezes mais caros e que requerem maior atenção profissional.

Considerando-se também o fato do envelhecimento da população decorrente da melhoria da qualidade e expectativa de vida dos indivíduos, a maior manutenção dos elementos dentários, com a conseqüente exposição das superfícies radiculares¹¹, levou a um aumento expressivo na incidência de cáries ocorridas em dentina. Trata-se de um substrato que, devido à maior concentração de substâncias orgânicas, é mais susceptível à desmineralização, apresentando, inclusive, maior rapidez na progressão da lesão cariosa¹. Esta, se não for paralisada ou tratada a tempo hábil, pode

promover perdas teciduais muito mais rápidas, comprometendo, em estágios mais avançados, a viabilidade do elemento dental na cavidade oral. Desta maneira, as cáries radiculares requerem maior atenção profissional.

A aplicação tópica de flúor ainda é a medida mais eficiente e acessível no controle do surgimento e progressão de lesões incipientes de cárie^{1,3,8}. De fato, a introdução de fluoreto nas águas de abastecimento tratou-se da medida mais eficaz para controle da doença cárie em âmbito nacional³. Contudo, há ainda regiões onde este recurso ainda não está disponível e, para a população destas regiões, é necessária a aplicação repetida de flúor para controle das lesões cariosas, o que pode ser efetuado de forma eficaz com o uso diário de dentifrícios fluoretados.

Ainda assim, aplicações tópicas profissionais de flúor são necessárias em indivíduos que apresentam risco identificado de doença³. Em alguns casos, porém, tais como em pacientes enfermos, senis e crianças, isto é, pacientes com dificuldades motoras e de locomoção que vivem em locais afastados, torna-se muitas vezes complicada a aplicação repetida de flúor para controle da progressão de lesão incipiente. Desta maneira, terapias que prolongassem o efeito cariostático do flúor, tais como a irradiação *laser*, seriam bem vindas.

Os *lasers* de alta intensidade são os mais indicados para tal medida, uma vez que exercem ação fototérmica sobre os tecidos duros dentais capazes de promover efeitos significativos seja na morfologia^{12,17,18,22}, na cristalografia¹⁹ ou mesmo na indução de mudanças químicas decorrentes da interação entre estes tecidos e, provavelmente, o fluor^{12,18}. De fato, os estudos que relatam efeitos promissores da irradiação do esmalte dental

com os lasers de alta intensidade datam da década de 70 e, desde então, vários comprimentos de onda, parâmetros de irradiação e diferentes associações com géis tópicos, vernizes, bochechos e dentifrícios fluoretados foram testados¹²⁻¹⁸. Mesmo apresentando resultados controversos na literatura, os autores concordam que os efeitos decorrentes da irradiação laser para redução da solubilidade dental provêm de mudanças químicas e cristalinas induzidas por ele, tais como a redução do teor de carbonato (substância que confere maior solubilidade à hidroxiapatita), redução de material orgânico intercrystalino, formação de novas fases cristalinas (tais como a formação de fosfato tricálcico e fosfato tetracálcico), dentre outras mudanças morfológicas e estruturais^{19,20,21}. Tais modificações possuem relação direta com a temperatura atingida durante as irradiações, daí a importância de se empregar lasers altamente absorvidos pela água e hidroxiapatita, principais constituintes dos tecidos duros dentais, os quais induziriam a aumentos de temperatura suficientes para promover tais alterações estruturais nestes tecidos²¹.

Por meio de sua absorção ressonante pelos radicais hidroxila tanto da água quanto da hidroxiapatita, a irradiação *laser* Er,Cr:YSGG atua em esmalte sob ação fotomecânica pelo mecanismo de ablação²¹, sendo bastante empregado, clinicamente, para a execução de preparos cavitários, cortes em osso e remoção de tecido cariado. Para a execução deste trabalho, embasados em resultados prévios¹⁸, foram empregadas densidades de energia abaixo do limiar de ablação, buscando-se minimizar alterações morfológicas ablativas, as quais poderiam induzir a um maior acúmulo de placa bacteriana. Embora esteja reportado na literatura que os

benefícios promovidos pela irradiação laser na redução da solubilidade do esmalte sejam maiores do que os malefícios causados pela maior retenção de placa bacteriana, ainda assim busca-se escolher parâmetros que minimizem a propagação do calor para a polpa e tecidos periodontais adjacentes, assim como que sejam evitados eventuais prejuízos estéticos²². Contudo, ressalta-se que é necessário o aquecimento superficial superior a, pelo menos, 100° C, de forma a induzir alterações químicas e/ou cristalinas nos substratos para que os mesmos se tornem mais resistentes à desmineralização^{19,20}.

O *laser* de Er,Cr:YSGG possui grande potencial em induzir modificações cristalográficas do esmalte quando empregado sob fluências de 5,6 J/cm² e 8,5 J/cm², uma vez que foram atingidas temperaturas superficiais superiores a 130°C durante as irradiações em esmalte²². Sabendo que a perda de água e de carbonato, componente que propicia o aumento da solubilidade do esmalte, se inicia em temperaturas ao redor de 100° C^{19,20}, pode-se inferir que as irradiações com o *laser* de Er,Cr:YSGG nestas densidades de energia pode promover um aumento da resistência do esmalte à desmineralização¹⁸. Neste estudo, porém, empregou-se densidade de energia de 2,8 J/cm² em dentina, tendo em vista que este tecido é menos mineralizado e, desta forma, as irradiações com densidades de energia maiores promoveriam alterações morfológicas significativas, visíveis a olho nu. Estudos prévios ainda não publicados realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron por difração de raios-X relatam que a densidade de energia de 2,8 J/cm² promove a formação de novas fases cristalinas também em dentina radicular⁵⁸, assim como estudos piloto

realizados por espectroscopia de reflexão no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) indicam alterações orgânicas significativas em dentina radicular irradiada com a mesma densidade de energia⁵⁹. Estes resultados prévios motivaram o emprego, apenas em dentina, de tal densidade de energia.

Tendo em vista os resultados previamente obtidos, quando se demonstrou que o *laser* de Er,Cr:YSGG pode influenciar na prevenção do surgimento de lesões incipientes de cárie^{18,24}, além de promover efeitos sinérgicos com o flúor fosfato acidulado, potencializando o efeito deste¹⁸, este estudo foi proposto para avaliar se o *laser* de Er,Cr:YSGG, quando associado ou não à aplicação tópica de flúor fosfato acidulado, poderia reduzir ou mesmo impedir a progressão de lesões incipientes de cárie já instaladas, fato que condiz com maior acuidade com a realidade clínica e muito mais prevalente principalmente em crianças e nos pacientes que normalmente procuram atendimento com as lesões já instaladas²⁹. Ainda assim, buscando-se uma maior amplitude nas ações preventivas a serem efetuadas, testou-se a ação também em dentina radicular, o que possibilitaria o tratamento em pacientes idosos.

O estudo de perda de dureza associado à ciclagem de pH é o método que melhor representa, *in vitro*, a dinâmica do processo de cárie que ocorre *in vivo*, além de avaliar com grande eficiência os efeitos de diferentes tratamentos sobre este processo³⁰. Neste trabalho, empregou-se método determinado previamente por Queiroz (2004)²⁵, o qual demonstrou que este método é capaz de avaliar o efeito anticárie de aplicações de fluoreto e altas

concentrações. Desta forma, apresenta sensibilidade para o uso no presente estudo.

Os dados obtidos neste projeto evidenciaram que, após a lesão de cárie estabelecida, o grupo sem tratamento obteve significativamente mais mineral perdido tanto em esmalte quanto em dentina após o segundo desafio cariogênico, o que realmente comprova a progressão das lesões induzidas *in vitro*, de forma semelhante ao sugerido por Queiroz (2004)²⁵. Desta maneira, o método apresentou-se válido para o propósito de avaliar a progressão de lesões.

Para ambos os substratos (esmalte e dentina), pode-se observar que a irradiação com *laser* Er,Cr:YSGG foi capaz de promover redução significativa ($p < 0,05$) na perda de dureza; contudo, tal redução não foi estatisticamente diferente daquela promovida quando apenas o FFA é aplicado sobre os tecidos. Isto demonstra que a irradiação *laser* modifica, de forma isolada, a estrutura tanto do esmalte quanto da dentina, possibilitando o aumento da resistência destes substratos à desmineralização na mesma amplitude que o FFA. Isto pode ser explicado pelo aumento de temperatura gerado pela irradiação *laser* nestes tecidos²², o qual propiciou mudanças químicas que alteraram a solubilidade da hidroxiapatita, diminuindo-a frente ao desafio cariogênico. De fato, estudos anteriores sugerem que a irradiação do esmalte com *laser* de Er,Cr:YSGG propiciou a formação de novas fases cristalinas (fosfato de tetracálcio e fosfato tricálcio na fase alfa)³¹, além de induzir a um aumento do tamanho dos cristais de hidroxiapatita³². Além disso, observou-se, tanto em esmalte quanto em dentina, que a irradiação *laser* nos mesmos parâmetros deste trabalho propiciou a redução de

carbonato (que garante maior solubilidade à hidroxiapatita), além da redução no conteúdo de material orgânico e água³². Estas mudanças provavelmente interferem na dinâmica do processo de cárie, reduzindo a percolação de íons e, com isso, diminuindo a dissolução do esmalte e da dentina.

Neste estudo, foi também observado que associação dos tratamentos não promoveu efeitos adicionais sobre a progressão da lesão incipiente de cárie, isto é, não se observou perda de dureza estatisticamente significativa na associação dos tratamentos quando comparado à ação individual dos mesmos tanto em esmalte quanto em dentina, o que também condiz com achados prévios¹⁸. Contudo, observou-se que a associação de tratamentos promoveu a maior porcentagem de inibição da progressão da lesão de cárie (77% contra 65% promovido pela aplicação de FFA em esmalte e 88% contra 70% promovido pela aplicação de FFA em dentina radicular). Ainda assim, a associação de tratamentos promoveu maiores efeitos em profundidade, tanto em esmalte quanto em dentina, do que os efeitos promovidos pelos tratamentos isolados. Desta forma, sugere-se que a associação de tratamentos possa ser mais promissora em longo prazo.

Embora os efeitos da associação dos tratamentos não se reflitam estatisticamente na perda de microdureza (Delta S), o que confirma achados anteriores¹⁸, estudos prévios apontam que o maior benefício da associação *laser* e fluoreto parece ser proveniente da maior formação e maior retenção de fluoreto de cálcio obtido após tratamentos, o que poderia prolongar o efeito cariostático do flúor¹⁸. Esta maior formação e maior retenção seria devido à formação de superfícies micro-ablacionadas, tal como ocorre com o emprego do *laser* de Er,Cr:YSGG nas densidades de energia empregadas

neste trabalho. As micro-ablações serviriam como sítios de deposição do fluoreto de cálcio formado, o que promoveria sua maior retenção, o que já foi sugerido previamente na literatura³³. Não obstante, a área exposta de hidroxiapatita estaria significativamente aumentada, tornando disponível maior quantidade de íons cálcio para formação de fluoreto de cálcio, daí a formação de maior quantidade desta substância. Embora este efeito tenha sido reportado previamente em esmalte dental humano¹⁸, parece que o mesmo efeito pode ser evidenciado em dentina, o que motiva a realização de estudos futuros.

As investigações que relatam a maior formação e retenção de fluoreto de cálcio decorrente das irradiações sugerem que o efeito preventivo da associação *laser* e flúor possa ser mais duradouro, o que não pôde ser evidenciado no presente estudo, o qual se trata de um desafio cariogênico curto e, portanto, insuficiente para demonstrar tal efeito. Desta maneira, sugere-se a realização de estudos posteriores com intervalos de tempo maiores e, talvez, o tipo de desafio cariogênico para se comprovar esta hipótese.

VII. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e a metodologia empregada no presente estudo, pode-se concluir que o *laser* de Er,Cr:YSGG reduz a perda de microdureza de esmalte e dentina radicular após o desafio cariogênico de forma similar à obtida pelo flúor fosfato acidulado, o que confirma seu potencial para prevenção da progressão de lesões incipientes de cárie. A associação dos tratamentos, embora não tenha resultado em efeitos somatórios considerando o período estudado, é o método que promove maior porcentagem de redução da progressão das lesões incipientes em esmalte e dentina radicular.

III. APÊNDICE



Parecer - Projeto N° 61/10/CEUA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **“AÇÃO DO LASER DE ER,CR:YSGG, QUANDO ASSOCIADO OU NÃO AO FLÚOR TÓPICO, NA PREVENÇÃO DA PROGRESSÃO DE LESÕES DE CÁRIE INCIPIENTES DE ESMALTE E DENTINA”** de responsabilidade das pesquisadoras **PATRICIA A. DA ANA** e **DENISE MARIA ZEZELL** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEUA .

São Paulo, 11 de junho de 2010

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Nanci do Nascimento", is written over a light blue horizontal line.

Profa. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEUA-IPEN

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LARSEN, M.J.; BRUN, C. A química da cárie dentária e o flúor – mecanismo de ação. In: THULSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**, São Paulo, SP; Livraria Editora Santos, 1995, p. 231 – 252.
2. MARTHALER, T.M. Changes in dental caries 1953 – 2003. **Caries Res.**, v. 38, p. 173 – 181, 2004.
3. CURY, J.A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: BARATIERI, L.N. et al. Odontologia Restauradora – Fundamentos e Possibilidades. São Paulo, SP; Editora Santos, 2001, p. 33 – 68.
4. ROBINSON, C.; SHORE, R.C.; BROOKES, S.J.; STRAFFORD, S.; WOOD, S.R.; KIRKHAM, J. The chemistry of enamel caries. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 11, n. 4, p. 481 – 495, 2000.
5. FEJERSKOV, O.; KIDD, E. Cárie Dentária: a doença e seu tratamento clínico. São Paulo, SP; Editora Santos: 2005.
6. KEYES, P.H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. **Arch. Oral Biol.**, v. 1, p. 304 – 320, 1960.
7. NEUBRUN, E. Cariology. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1978.
8. FEATHERSTONE, J.D.B. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. **Comm. Dent. Oral Epidemiol.**, v. 27, p. 31 – 40, 1999.
9. BRATHALL, D.; HANSEL-PETERSSON, B.; SUNDBERG, G. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? **Eur. J. Oral Sciences.**, v. 104, p. 433 – 435, 1996.
10. NARVAI, P.C., FRAZÃO, P., CASTELLANOS, R.A. Declínio na experiência de cárie em dentes permanentes de escolares brasileiros no final do século XX. **Odontol. e Sociedade**, v. 1, n. ½, p. 25 – 29, 1999.
11. ETTINGER, R.L. Oral health needs of the elderly – an international review. **Int. Dent. J.**, v. 43, n. 4, p. 348 – 354, 1993.
12. ZECELL, D.M.; BOARI, H.G.D.; ANA, P.A. EDUARDO, C.P.; POWELL, G.L. Nd:YAG laser in caries prevention: a clinical trial. **Lasers Surg. Med.**, v. 41, p. 31 – 35, 2009.
13. SANTOS, M.N.; FRIED, D.; HILO, M.R.; FEATHERSTONE, J.D.B. Effect of a new carbon dioxide laser and fluoride on occlusal caries progression

- in dental enamel. In: RECHAMANN, P.; FRIED, D.; HENNIG, T. **Lasers in Dentistry II**. Bellinghan, WA: Proc. SPIE n. 4610, p. 132 – 138, 2002.
14. SOGNAES, R.F.; STERN, R.H. Laser effect on resistance of human enamel to demineralization *in vitro*. **J. S. Calif. Dent. Assoc.**, v. 33, p. 328 – 329, 1965.
 15. ZECELL, D.M.; CECCHINI, S.C.; EDUARDO, C.P.; MATSUMOTO, K.; DE ROSSI, W.; NOGUEIRA, G.E.; BERRETTA, JR.; VIEIRA JUNIOR, N.D.; MORATO, S.P. Experimental studies of the applications of the holmium laser in dentistry. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 13, n. 4, p. 283 – 289, 1995.
 16. WESTERMANN, G.H.; ELLIS, R.W.; LATTA, M.A.; POWELL, G.L. An *in vitro* study of enamel surface microhardness following argon laser irradiation and acidulated phosphate fluoride treatment. **Ped. Dent.**, v. 25, n. 5, p. 497 – 500, 2003.
 17. BEVILACQUA, F.M.; ZECELL, D.M.; MAGNANI, R.; ANA, P.A.; EDUARDO, C.P. Fluoride uptake and acid resistance of enamel irradiated with Er:YAG laser. **Lasers Med. Sci.**, v. 23, p. 141 – 147, 2008.
 18. ANA, P.A.; TABACHOURY, C.P.M.; CURY, J.A.; ZECELL, D.M. Effect of Er,Cr:YSGG laser and fluoride application on enamel demineralization. **Caries Res.**, n. 41, p. 325 – 326, 2007a.
 19. BACHMANN, L.; ZECELL, D.M. **Estrutura e composição de esmalte e dentina**. São Paulo, SP; Editora Livraria da Física, 2005.
 20. FOWLER, B.O.; KURODA, S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. **Calcif. Tissue Int.**, v. 38, p. 197 – 208, 1986.
 21. SEKA, W.; FEATHERSTONE, J.D.B.; FRIED, D.; VISURI, S.R.; WALSH, J.T. Laser ablation of dental hard tissue: from explosive ablation to plasma-mediated ablation. In: WIGDOR, H.A.; FEATHERSTONE, J.D.B.; WHITE, J.M.; NEEV, J. **Lasers in Dentistry II**. Bellinghan, WA. Proc. SPIE n. 2672, p. 144 – 158, 1996.
 22. ANA, P.A.; BLAY, A.; MIYAKAWA, W.; ZECELL, D.M. Thermal analysis of teeth irradiated with Er,Cr:YSGG laser at low fluences. **Laser Phys. Letters.**, v. 4, p. 827 – 830, 2007b.
 23. APEL, C.; MESTER, J.; SCHMITT, N.; GRABER, H.G.; CUTKNECHT, N. Calcium solubility of dental enamel following sub-ablative Er:YAG and Er,Cr:YSGG laser irradiation *in vitro*. **Lasers Surg. Med.**, v. 30, n. 5, p. 337 – 341, 2002.

24. FREITAS, P.M.; RAPOXO-HILO, M.; EDUARDO, C.P.; FEATHERSTONE, J.D.B. *In vitro* evaluation of Er,Cr:YSGG laser-treated enamel demineralization. ***Lasers Med. Sci.***, v. 25, n. 2, p. 165 – 170, 2010.
25. QUEIROZ, C.S. Modelos de estudos *in vitro* para avaliar o efeito do fluoreto na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina. ***Tese (Doutorado em Cariologia)***. Faculdade de Odontologia da Unicamp, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2004.
26. DELBEM, A.C.B.; CURY, J.A. Effect of application time of APF and NAF gels on microhardness and fluoride uptake of *in vitro* enamel caries. ***Am. J. Dent.***, v. 15, n. 3, p. 169 – 172, 2002.
27. TEN CATE, J.M.; DUIJSTERS, P.P.E. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. ***Caries Res.***, v. 16, p. 201 – 210. 1982.
28. TAGLIAFERRO, E.P.S. Avaliação *in vitro* da associação de laser de CO₂ e flúor fosfato acidulado na inibição da progressão de cárie em esmalte de dentes decíduos. ***Dissertação (Mestrado em Odontologia)***. Faculdade de Odontologia da Unicamp, Piracicaba, 2004.
29. TAGLIAFERRO, E.P.S.; RODRIGUES, L.K.; NOBRE DOS SANTOS, M.; SOARES, L.E.; MARTIN, A.A. Combined effects of carbon dioxide laser and fluoride on dematerialized primary enamel: an *in vitro* study. ***Caries Res.***, v. 41, n. 1, p. 74 – 76, 2007.
30. WHITE, D.J. The application of *in vitro* models to research on demineralization and demineralization of the teeth. ***Adv. Dent. Res.***, v. 9, n. 3, p. 175 – 193, 1995.
31. BACHMANN, L.; ROSA, K.; ANA, P.A.; ZECELL, D.M.; CRAIEVICH, A.F.; KELLERMANN, G. Crystalline structure of human enamel irradiated with Er,Cr:YSGG laser. ***Laser Physics Letters.***, v. 6, p. 159 – 162, 2009.
32. ZECELL, D.M.; ANA, P.A.; BENETTI, C.; GOULART, V.P.; BACHMANN, L.; TABCHOURY, C.P.M; CURY, J.A. Compositional and crystallographic changes on enamel when irradiated by Nd:YAG or Er,Cr:YSGG lasers and its resistance to demineralization when associated with fluoride. ***Lasers in Dentistry XVI***, Proc. Of SPIE v. 7549, p. 75490G1 – 7549G12, 2010.
33. YOKOYAMA, K.; KIMURA, Y.; MATSUMOTO, K.; FIJISHIMA, A.; MIYAZAKI, T. Preventive effects of tooth fracture by pulse Nd:YAG laser irradiation with demine silver fluoride solution. ***J. Clin. Laser Med. Surg.***, v. 19, n. 6, p. 315 – 318, 2001.

34. CLARKSON, J.J.; MC LOUGHLIN, J. Role of fluoride in oral health promotion. *Int. Dent. J.*, v. 50, n. 3, p. 119 – 128, 2000.
35. FEATHERSTONE, J.D.B. Caries detection and prevention with *laser* energy. *Dent. Clin. North. Am.*, v. 44, p. 955 – 969, 2000.
36. STERN, R.H.; SOGNAES, R.F.; GOODMAN, F. *Laser* effect on *in vitro* enamel permeability and solubility. *J. Am. Dent. Assoc.*, v. 73, n. 4, p. 838 – 843, 1965.
37. STERN, R.H.; SOGNAES, R.F. *Laser* inhibition of dental caries suggested by first tests *in vivo*. *J. Am. Dent. Assoc.*, v. 85, p. 1087 – 1090, 1972.
38. FEATHERSTONE, J.D.B.; NELSON, D.G.A. *Laser* effects on dental hard tissue. *Adv. Dent. Res.*, v. 1, p. 21 – 26, 1987.
39. KURODA, S.; FOWLER, B.O. Compositional, structural, and phase changes in *in vitro laser*-irradiated human tooth enamel. *Calcif. Tissue Int.*, v. 36, p. 361 – 369, 1984.
40. OHO, T.; MORIOKA, T. A possible mechanism of acquired acid resistance of human dental enamel by *laser* irradiation. *Caries Res.*, v. 24, n. 2, p. 86 – 92, 1990.
41. LEGEROS, R.Z. Calcium phosphates in demineralization/remineralization processes. *J. Clin. Dent.*, v. 10, n. 2, p. 65 – 73, 1999.
42. CHADWICK, D.J.; CARDEW, G. *Dental Enamel*. London, UK: Chichester-Wiley, 1997.
43. BRUDEVOLD, F. Chemical composition of the teeth in relation to caries. In: SOGNAES, R.F. *Chemistry and prevention of dental caries*. Springfield, MA: Charles C. Thomas, 1962, p. 32 – 88.
44. GWINNETT, A.J. Structure and composition of enamel. *Oper. Dent.*, Supl. 5, p. 10 – 17.
45. MARGOLIS, H.C.; MORENO, E.C. Kinetic and thermodynamic aspects of enamel demineralization. *Caries Res.*, v. 19, p. 22 – 35, 1985.
46. NAVIA, J.M. Plaque biochemistry. In: MENAKER, L. *The biologic basics of dental caries*. Maryland: Harper & Row, 1980, p. 276 – 292.
47. TEN CATE, J.M.; BUIJS, M.J.; DAMEN, J.J.M. pH-cycling of enamel and dentin lesions in the presence of low concentrations of fluoride. *Eur. J. Oral Sci.*, v. 103, p. 362 – 367, 1995.

48. FEATHERSTONE, J.D.B.; BARRTT-VESPONE, N.A.; FRIED, D.; KANTOROWITZ, Z.; SEKA, W. CO₂ laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. **J. Dent. Res.**, v. 77, n. 6, p. 1397 – 1403, 1998.
49. TEN CATE, A.R. **Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função**. Rio de Janeiro, S.P.: Guanabara Koogan, 2001.
50. ANA, P.A. Estudo *in vitro* da resistência à desmineralização e da retenção de flúor em esmalte dental irradiado com Laser de Er,Cr:YSGG. **Tese (Doutorado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Materiais)**. IPEN, autarquia associada à Universidade de São Paulo, 2007.
51. FERJESKOV, O.; KIDD, E. **Cárie Dentária: a doença e seu tratamento clínico**. São Paulo, S.P.: Editora Santos, 2005.
52. ZECELL, D.M.; RIBEIRO, M.S.; ANA, P.A. Apostila da Disciplina interação da luz laser com tecidos biológicos: aplicações. **Curso de Mestrado Profissionalizante “Lasers em Odontologia”**, 2008.
53. SIEVERS, M.; KOORT, H.J.; ALTSHULER, G.; ERFEEV, A.; FRENTZEN, M. The ablation of dental hard tissues by Er:YSGG laser. In: INTERNATIONAL SOCIETY FOR LASERS IN DENTISTRY, 1992, Salt Lake City. **Proceedings...** Salt Lake City: p. 255 – 256.
54. STOCK, K.; HIBST, R.; KELER, U. Comparison of Er:YAGG and Er:YSGG ablation of dental hard tissues. In: ALTSHULER, B.B.; BIRNGRUBER, R.; FANTE, M.D.; HIBST, R.; HOENIGSMANN, H.; KRASNER, N.; LAFFITTE, F. **Medical Applications of lasers in dermatology, ophthalmology, dentistry and endoscopy**. Bellingham, WA: Proc. SPIE, v. 3192, p. 88 – 95, 1997.
55. HADLEY, J.; YOUNG, D.A.; EVERSOLE, L.R.; GORNBEIN, J.A. A laser-powered hydrokinetic system for caries removal and cavity preparation. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 131, p. 777 – 785, 2000.
56. MATSUMOTO, K.; HOSSAIM, M.; HOSSAIM, M.M.I.; KAWANO, H.; KIMURA, Y. Clinical assessment of Er,Cr:YSGG laser application for cavity preparation. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 20, n. 1, p. 17 – 21, 2002.
57. HOSSAIM, M.; KIMURA, Y.; NAKAMURA, Y.; YAMADA, Y.; KNOSHITA, J.I.; MATSUMOTO, K. A study on acquired acid resistance of enamel and dentin irradiated by Er,Cr:YSGG laser. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 19, n. 3, p. 159 – 163, 2001.
58. ANA, P.A.; BACHMANN, L.; CURY, J.A.; ZECELL, D.M. Er,Cr:YSGG laser and fluoride for caries prevention: the influence on chemical

composition and on resistance to demineralization of enamel and dentin. *Laser Physics Abstracts.*, v. 1, n. , p. 102, 2010.

59. ZECELL DM; ANA PA; ALBERO FG; BACHMANN L. Effects of lasers on chemical composition of enamel and dentin. In: **29th ASLMS Annual Conference**, 2009, Maryland. Lasers in Surgery and Medicine, 2009.