

ADRIANA DA COSTA RIBEIRO

**TERAPIA ENDODÔNTICA ASSOCIADA À IRRADIAÇÃO DO CANAL
RADICULAR COM LASER DE DIODO: AVALIAÇÃO TÉRMICA,
MORFOLÓGICA, MICROBIOLÓGICA E DA INFILTRAÇÃO
MARGINAL APICAL**

São Paulo

2006

Adriana da Costa Ribeiro

Terapia endodôntica associada à irradiação do canal radicular com laser de diodo: avaliação térmica, morfológica, microbiológica e da infiltração marginal apical

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

Área de Concentração: Endodontia

Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Zezell

São Paulo

2006

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ribeiro AC. Terapia endodôntica associada à irradiação do canal radicular com laser de diodo: avaliação térmica, morfológica, microbiológica e da infiltração marginal apical [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, 29/11/2006

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A minha amada família, minha mãe Janete, meu pai Gilberto e meu irmãozinho André. Dedicar esta conquista a vocês é uma pequena demonstração da tamanha gratidão que sinto, amores da minha vida, que tanto incentivaram e torceram pelos sonhos desta filha e irmã que os ama imensamente.

Ao querido e amado Aécio Yamada Jr., pelo amor, apoio e incentivo recebidos todos os dias. Sentimentos que fizeram desta uma caminhada muito especial, rica em momentos de alegria e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido a vida, minha maior riqueza, que ilumina o meu caminho e abençoa os meus passos.

À Profa. Denise Maria Zezell, não só pela oportunidade e pelo privilégio de ser orientada, mas especialmente pela amizade construída. O carinho, o apoio, a dedicação a fazem uma pessoa muito querida e especial.

Ao professor João Humberto Antoniazzi pelo pronto apoio ao desenvolvimento deste estudo e pelas ricas discussões realizadas. O seu modelo de educador é muito especial.

À professora Márcia Pinto Alves Mayer pelo constante incentivo e importantes contribuições, que permitiram o engrandecimento desta proposta de trabalho e, sobretudo o meu crescimento profissional.

Ao amigo e estimado orientador Professor Anderson Stevens Leônidas Gomes pelo incentivo e apoio. Você é um grande exemplo de profissionalismo e competência a ser seguido. Obrigada pelas oportunidades proporcionadas, elas foram importantíssimas para o meu amadurecimento pessoal e científico.

Ao Professor José Luiz da Silva Lage-Marques pela receptividade e oportunidade de ingresso na disciplina de Endodontia.

Ao Professor Gessé Eduardo Calvo Nogueira pela ajuda nas análises e interpretações estatísticas dos trabalhos realizados ao longo deste período.

Ao Professor Antônio Carlos Bombana pelo importante apoio, especialmente na etapa final desta conquista.

Ao Professor John M. Girkin pelo incentivo e correção dos manuscritos em inglês.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco pela participação e incentivo tão importantes na minha formação acadêmica.

A minha vovozinha querida que sempre ora por mim. Seu amor e suas orações são muito valiosos. Obrigada Terezinha de Jesus.

Aos tios, tias, primos e primas que fazem parte da maior torcida que um ser humano pode ter, essa torcida é campeã.

À família Yamada: Sr. Aécio, Sra. Yossie e Alessandra Mary pelo fundamental apoio e carinho tão importantes.

Aos Professores do Centro de Lasers e Aplicações Anderson Zanardi de Freitas, Luiz Vicente Gomes Tarelho, Niklaus Wetter, Nilson Dias Vieira Jr., Sônia Licia Baldochi, Vera Lúcia Ribeiro pela amizade, companheirismo e ajuda. A convivência com vocês foi muito especial e agradável.

Às amigas Valdênia e Juliana pelo fantástico acolhimento e carinho. O meu agradecimento pelos valiosos conselhos concedidos.

Às amigas Fernanda, Maritsa, Robélia, Carol pela brilhante amizade construída. O meu carinho por vocês é enorme. Foi muito bom conhecer vocês e compartilhar tantos momentos importantes.

À amiga Professora Martha Simões Ribeiro por todos os gestos de amor e cuidado oferecidos carinhosamente ao longo dessa jornada de vida. Você é majestosamente especial.

Aos amigos Daniela Texeira da Silva, Luciano Bachmann, Sandro Stolf, Walter Miwakawa pelo ombro amigo nos momentos fáceis e difíceis, pelos conselhos concedidos, pelos agradáveis momentos de companheirismo vividos e por tudo o mais. Vocês são muito queridos.

Aos estimados amigos do Laboratório de Biofotônica Carol, Cássius, Claudia, Felipe, Marcella, Patrícia, Renata, Thiago por todos os momentos de colaboração e companheirismo.

Aos amigos do Centro de Lasers e Aplicações Aguinaldo, Alessandro, Aninha, Fábio, André Filipe, Ilka, Ilomar, Karin, Luiz Claudio, Regina, Renato, Silvinha e Stella pela agradável convivência compartilhada ao longo destes anos.

Aos amigos de Pós-graduação Anelise, Carmem, Christiane, Claudia, Karina, Guilherme, Julieta, Ronise pela amizade e companheirismo.

Aos amigos Ana Lucrécia, Ana Carolina, Andréa, Claudinha, Fernando e Raquel pelo carinho e apoio incondicionalmente doados, apesar da distância geográfica.

Ao técnico do Laboratório de Biofotônica, Valdir pela amizade e ajuda em muitas das fases experimentais deste estudo.

Aos funcionários do Centro de Lasers e Aplicações.

Aos funcionários do Laboratório Especial de Lasers em Odontologia Liliane, Joelma e Haroldo por toda ajuda e carinho dados.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Oral: Alessandra, Amanda, Ana Carla, César, Claudia Ota, Cláudia Perez, Dione, Ellen, Fábio, Ireneu, Josy, Marcelo, Priscila, Sílvia, Tânia agradeço por cada minuto de aprendizagem e verdadeiro companheirismo. Vocês são fabulosos.

Ao técnico do laboratório de Microbiologia Oral João Paulo, sempre tão bondoso e solícito, pela importante ajuda.

Às queridas secretárias do Centro de Lasers e Aplicações Andréa e Elsa pelo inesquecível carinho e atenção sempre prestados.

Ao Departamento de Dentística e Endodontia da Faculdade de Odontologia da USP pela oportunidade e apoio ao desenvolvimento deste estudo.

Aos Professores da Disciplina de Endodontia da FOUSP pela convivência científica compartilhada.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pela receptividade, apoio e disponibilidade das dependências físicas do Centro de Lasers e Aplicações e do Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais.

Ao Laboratório Especial de Lasers em Odontologia (LELO) pela disponibilização do espaço físico e do laser de diodo.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da USP por disponibilizar entre suas dependências o parque de equipamentos do Laboratório de Microbiologia Oral.

Aos funcionários do Serviço de Secretaria da Faculdade de Odontologia da USP pelos auxílios prestados.

Aos pacientes participantes deste estudo pela confiança e disponibilidade.

À Farmácia Fórmula & Ação pelo fornecimento de alguns dos produtos utilizados neste estudo.

À Dentsply Brasil pela doação do cimento endodôntico AH Plus.

À Companhia Brasileira de Esterilização pelos serviços de radioesterilização prestados.

A todos os funcionários do IPEN.

Ao Procad/Capes e ao Cepid/Fapesp.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado no programa Demanda Social.

Ao CNPq pelo apoio financeiro a este estudo pelo Projeto Universal (478865/2004-0).

Ribeiro AC. Terapia endodôntica associada à irradiação do canal radicular com laser de diodo: avaliação térmica, morfológica, microbiológica e da infiltração marginal apical [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da irradiação do canal radicular pelo laser de diodo, quando associado à terapêutica endodôntica tradicional: no aumento da temperatura na superfície radicular externa; nas alterações morfológicas da dentina do canal radicular; no selamento marginal apical após obturação do canal radicular e no potencial de redução microbiana. O aumento de temperatura foi monitorado durante a irradiação do canal radicular de incisivos inferiores por câmera termográfica. Os parâmetros de irradiação foram: grupo de emissão contínua (CW): $P=2,5$ W e grupo de emissão pulsada $\bar{P}=1,25$ W. A avaliação das alterações morfológicas por MEV das amostras irradiadas nas condições acima citadas foram comparadas com amostras não irradiadas. O grau de infiltração marginal apical foi mensurado em amostras irradiadas (CW; $P = 2,5$ W) ou não irradiadas, e obturadas por um dos três cimentos endodônticos: N-Rickert, AH Plus ou Apexit. O grau de penetração linear foi medido após o período de imersão das amostras na solução de azul de metileno. O potencial de redução microbiana promovido pela associação do laser à terapêutica endodôntica tradicional foi avaliado em dentes portadores de infecção endodôntica primária por técnicas de cultura e PCR. A irrigação de NaOCl 0,5 % e uso de hidróxido de cálcio (grupo controle) foram associados à irradiação no grupo laser (CW; $P=2,5$ W). Foram avaliadas: a redução do número de UFC dos anaeróbios viáveis, a quantidade de *E. faecalis* e de lactobacilos/amostra, e a proporção de *E. faecalis* e de lactobacilos/microrganismos viáveis. O aumento de temperatura na superfície radicular externa durante a irradiação do canal radicular nos regimes de emissão contínuo e pulsado não excedeu o limite crítico de 10 °C. A variação de

temperatura mediana máxima na região apical usando o método de *Wilcoxon* ($p < 0,05$) foi de 8,6 °C na irradiação contínua e de 3,3 °C na emissão pulsada. O tempo de resfriamento de 20 segundos foi determinado entre os 5 ciclos de irradiação. As alterações morfológicas promovidas pela irradiação do canal revelaram fusão da dentina e obliteração dos túbulos dentinários especialmente no terço apical, em ambas as condições de irradiação. A irradiação do canal radicular pelo laser de diodo reduziu significativamente o grau de infiltração marginal apical nos canais obturados pelo cimento Apexit (*Kruskal Wallis* $p < 0,05$). A prevalência dos anaeróbios viáveis ao final do tratamento foi menor no grupo laser do que no grupo controle, embora não tivesse sido constatada diferença significativa entre os grupos (*Mann-Whitney* $p > 0,05$). O percentual de lactobacilos/microrganismos viáveis no início do tratamento foi 22 % reduzindo a zero ao final, no grupo controle. Esse microrganismo não foi detectado no grupo laser. A proporção de *Enterococcus*/microrganismos viáveis variou de 36 %-50 % no grupo controle, e 22 %-0 % no grupo laser, no início e final do tratamento, respectivamente. Nas condições testadas, os resultados sugerem que o laser de diodo mostrou-se uma ferramenta possível de ser incorporada à Endodontia, contudo os efeitos biológicos são similares à terapêutica endodôntica tradicional bem executada.

Palavras-Chave: Laser de diodo; Redução microbiana; Infecção primária; *E. faecalis*; *Lactobacillus*; Estudo clínico; Aumento de temperatura; Infiltração marginal apical

Ribeiro AC. Endodontic root canal therapy using diode laser irradiation: thermographic, morphological, microbiological and apical marginal leakage studies [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of diode laser irradiation associated with endodontic therapy. The aspects analyzed were: temperature rise at the external root surface, morphological changes at the dentine root walls, apical marginal leakage after root sealing, and microbiological reduction after laser irradiation. The temperature rise in inferior incisor teeth was monitored using a thermographic camera. Two laser treatment parameters were investigated: continuous emission mode (CW) with $P = 2.5 \text{ W}$ and pulsed emission mode (PL) with average power $\bar{P} = 1.25 \text{ W}$. The morphological changes of irradiated samples were analyzed by SEM for both treatment modes and compared with a non-irradiated control group. The apical marginal leakage was measured after the immersion in methylene blue solution for irradiated (CW; $P = 2.5 \text{ W}$) and non-irradiated samples sealed by one of the following endodontic sealers: N-Rickert, AH Plus or Apexit. The reduction in microbiological activity after conventional endodontic therapy and after laser irradiation was evaluated in primary endodontic infection using culture and PCR techniques, where the control group used conventional 0.5 % NaOCl solution and calcium hydroxide treatment was compared with laser irradiation (CW; $P = 2.5 \text{ W}$). The reduction of viable anaerobic microorganisms, the quantity of *E. faecalis* and *Lactobacillus* per samples, and the rate of *E. faecalis* and *Lactobacillus* per viable microorganism were analyzed. The temperature rise at external root surface during root canal irradiation in both continuous and pulsed emission modes was demonstrated not exceed the safety limit of 10 °C. The maximum median temperature variation was 8.6 °C (CW) at the continuous emission mode and 1.6 °C at pulsed mode (PL) (Wilcoxon, $p < 0.05$). The optimal “resting time” between each of five irradiation cycles was

determined to be 20 seconds to allow for tissue cooling and hence to prevent potential dangerous rises in the tissue temperature. SEM analysis revealed melting of dentine and closure of dentinal tubules especially at apical third for both irradiation conditions. The apical marginal leakage was significantly reduced in the irradiated samples sealed with Apexit (*Kruskal Wallis*, $p < 0.05$). The prevalence of the viable anaerobic microorganisms exhibited reduced with time in both the control and laser groups with no statistical difference (*Mann-Whitney* $p > 0.05$). The *Lactobacillus* rate per viable microorganisms in the control group was 22 % at the beginning of the treatment and decreasing to zero at the end. This microorganism was not detected in laser group. The rate of *Enterococcus* per viable microorganism ranged 36 % to 50 % in the control group and 22 % to 0 % in laser group at the begin and the end of treatments, respectively. The conclusion is that diode laser technology is suitable for applications in endodontic therapy under the conditions tested in this study, however, the biological effects are similar to well done conventional endodontic therapy.

Keywords: Diode laser; Bacterial reduction; Primary infection; *E. faecalis*; *Lactobacillus*; Clinical trial; Temperature rise; Apical leakage

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 2.1 – Representação esquemática dos parâmetros físicos e biológicos envolvidos na geração de efeitos térmicos..... | 27 |
| Figura 4.1 – Distribuição dos grupos experimentais na avaliação da infiltração marginal apical..... | 61 |
| Figura 4.2 – Ilustração do procedimento de mensuração da infiltração linear do corante pelo programa ImageJ | 64 |
| Figura 4.3 – Representação esquemática das terapêuticas antimicrobianas empregadas nos grupos controle e laser | 66 |
| Figura 4.4 – Momentos das coletas das amostras microbiológicas nos grupos controle e laser | 69 |
| Figura 4.5 – Coleta microbiana intracanal com cone de papel absorvente (A) e acondicionamento dos cones em tubos de VGMA III (B) | 70 |
| Figura 4.6 – Aliquota semeada em ágar Rogosa (A), placa com crescimento de <i>Lactobacillus</i> após 48 horas de incubação em estufa CO ₂ a 37 °C..... | 72 |
| Figura 5.1 – Imagem termográfica adquirida durante a irradiação da amostra pelo laser de diodo | 77 |
| Figura 5.2 – Comportamento médio da temperatura máxima (a) e das temperaturas nos terços apical (b), médio (c) e cervical (d) medidas pela câmera termográfica na superfície radicular externa das amostras dos grupos CW (A) e PL (B) | 78 |
| Figura 5.3 – Micrografias eletrônicas dos terços apical (A) e médio (B) de amostra irradiada pelo laser de diodo sob o regime de emissão contínuo (grupo CW) | 81 |
| Figura 5.4 – Micrografias eletrônicas dos terços apical (A) e médio (B) de amostra irradiada pelo laser de diodo sob o regime de emissão pulsado (grupo PL) | 82 |

| | |
|--|----|
| Figura 5.5 – Micrografias eletrônicas dos terços apical (A) e médio (B) de amostra não irradiada (grupo controle) | 83 |
| Figura 5.6 – Infiltração linear média dos grupos experimentais e os respectivos valores de desvio padrão..... | 85 |
| Figura 5.7 – Médias em escala logarítmica dos microrganismos anaeróbios viáveis (UFC/amostra) determinadas nas coletas 01, 02, 03 e 04 dos grupos controle e laser | 89 |
| Figura 5. 8 – Porcentual de <i>Enterococcus</i> detectado por cultura ou PCR nas diferentes fases do tratamento nos grupos controle e laser | 93 |
| Figura 5.9 – Distribuição das porcentagens dos microrganismos viáveis entre os grupos controle e laser nas diferentes fases do tratamento | 95 |
| Figura 5.10 – Porcentagem de <i>Enterococcus</i> por microrganismos anaeróbios viáveis nos grupos controle e laser | 96 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1 – Efeitos térmicos da irradiação laser nos tecidos biológicos | 26 |
| Tabela 5.1 – Variações da temperatura medidas na região apical no último ciclo de irradiação..... | 79 |
| Tabela 5.2 – Valores máximos, mínimos e médios de infiltração marginal apical, em milímetros, mediana e desvio padrão obtidos em função dos grupos de tratamento (controle e laser) e cimentos endodônticos avaliados..... | 84 |
| Tabela 5.3 – Valores de mediana ()* e de probabilidade ($p \leq 0,05$ %) avaliados pelo método de Mann-Whitney..... | 86 |
| Tabela 5.4 – Número de microrganismos viáveis (UFC/amostra) determinados nas amostras obtidas no grupo controle antes do tratamento (coleta 01), imediatamente após o PQC (coleta 02), no início da segunda sessão (coleta 03) e no início da terceira sessão (coleta 04) | 88 |
| Tabela 5.5 – Número de microrganismos viáveis (UFC/amostra) determinados nas amostras obtidas no grupo laser antes do tratamento (coleta 01), imediatamente após o PQC (coleta 02), no início da segunda sessão (coleta 03) e no início da terceira sessão (coleta 04) | 88 |
| Tabela 5.6 – Resultado do teste de normalidade (<i>Shapiro-Wilk</i> - $p < 0,05$) dos dados das UFC de microrganismos viáveis por amostra no grupo controle nas coletas 01, 02, 03 e 04 | 90 |
| Tabela 5.7 - Resultado do teste de normalidade (<i>Shapiro-Wilk</i> - $p < 0,05$) dos dados das UFC de microrganismos viáveis por amostra no grupo laser nas coletas 01, 02, 03 e 04 | 90 |
| Tabela 5.8 – Avaliação entre as médias das UFC de microrganismos viáveis por amostra das coletas realizadas em cada um dos grupos nas diferentes fases do tratamento. Teste de <i>Wilcoxon</i> ($p < 0,05$) | 91 |
| Tabela 5.9 – Número de amostras positivas para o gênero <i>Enterococcus</i> , detectado por cultura (UFC/amostra), e para <i>E. faecalis</i> (+/-), identificado por PCR, no grupo controle nas diferentes fases do estudo | 92 |
| Tabela 5.10 – Número de amostras positivas para o gênero <i>Enterococcus</i> , detectado por cultura (UFC/amostra), e para <i>E. faecalis</i> (\pm), identificado por PCR, no grupo controle nas diferentes fases do estudo | 92 |

| | |
|---|----|
| Tabela 5.11 – Amostras positivas para o <i>Lactobacillus</i> detectado por cultura (UFC/amostra) no grupo controle | 94 |
| Tabela 5.12 – Porcentagem de microrganismos anaeróbios viáveis, <i>Enterococcus</i> e <i>Lactobacillus</i> em canais radiculares identificados por cultura no grupo controle (n = 14) | 94 |
| Tabela 5.13 – Porcentagem de microrganismos anaeróbios viáveis, <i>Enterococcus</i> e <i>Lactobacillus</i> em canais radiculares identificados por cultura no grupo laser (n = 9) | 95 |
| Tabela 5.14 – Distribuição das frequências de sítios positivos e negativos para <i>Enterococcus/E. faecalis</i> detectados por cultura ou PCR nas diferentes fases do tratamento | 97 |
| Tabela 5.15 – Números de concordância e discordância na identificação <i>Enterococcus/E. faecalis</i> detectados por cultura ou PCR | 98 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|--|
| DNA | ácido desoxiribonucleíco |
| EDTA | ácido etileno diamino tetracético |
| EDTA-T | associação EDTA – detergente (ácido etileno-diamino-tetra-acético e detergnete tergentol |
| RNA | ácido ribonucléico |
| AH | AH-plus |
| AP | apexit |
| NaCl | cloreto de sódio |
| CRT | comprimento real de trabalho |
| CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| CW | contínuo |
| CAPES | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior |
| CO ₂ | dióxido de carbono |
| Er:YAG | érbio:YAG (érbio: ítrio-alumínio-granada) |
| GaAs | <i>galium arsenide</i> (arseneto de gálio) |
| GaAlAs | <i>galium aluminum arsenide</i> (arseneto de gálio e alumínio) |
| Hz | hertz |
| NaOCl | hipoclorito de sódio |
| ICB | Instituto de Ciências Biomédicas |
| IPEN | Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares |
| MEV | microscopia eletrônica de varredura |
| Nd:YAG | neodímio-YAG (neodímio: ítrio-alumínio-granada) |

| | |
|-------------------------------|---|
| NR | N-Rickert |
| PMCC | paramonoclorofenol canforado |
| H ₂ O ₂ | peróxido de hidrogênio |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> – reação de polimerase em cadeia |
| P | potência |
| \bar{P} | potência média |
| pH | potencial hidrogênico |
| PQC | preparo químico-cirúrgico |
| PL | pulsado |
| TE | tris EDTA |
| UFC | unidades formadoras de colônia |
| USP | Universidade de São Paulo |
| ΔT | variação de temperatura |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|--------------------|-----------------------------|
| cm | centímetro |
| μ_a | coeficiente de absorção |
| μ_s | coeficiente de espalhamento |
| \emptyset | diâmetro |
| $^{\circ}\text{C}$ | graus Celsius |
| > | maior que |
| \pm | mais ou menos |
| < | menor que |
| μL | microlitros |
| μm | micrometro |
| mm | milímetro |
| ms | milissegundos |
| nm | nanometro |
| nm | nanomol |
| ns | nanossegundos |
| n° | número |
| n | número de amostras |
| % | porcentual |
| ps | picossegundos |
| / | por |
| s | segundos |
| W | Watts |

SUMÁRIO

| | p. |
|--------------------------------------|-----|
| 1 INTRODUÇÃO | 20 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 24 |
| 3 PROPOSIÇÃO | 52 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 54 |
| 5 RESULTADOS | 75 |
| 6 DISCUSSÃO | 99 |
| 7 CONCLUSÕES | 117 |
| REFERÊNCIAS | 119 |
| ANEXOS | 131 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas observa-se o crescente desenvolvimento da tecnologia laser nos diversos segmentos da área da saúde. Entre as novas áreas de aplicação tem demonstrado ampla versatilidade quando associada às condutas endodônticas da terapêutica tradicional.

Os estudos em Endodontia vêm definindo as vantagens da associação do uso dos lasers na terapêutica endodôntica tradicional como agentes potencializadores do sucesso do tratamento. Encontra-se na literatura estudos e relatos clínicos sobre o uso dos lasers no tratamento da hipersensibilidade dentinária, na modificação estrutural da dentina, no diagnóstico da vitalidade do tecido pulpar, no capeamento pulpar indireto, na pulpotomia, no preparo e desinfecção dos canais radiculares, na apicectomia e na obturação retrógrada (1,2,3,4,5).

Um dos mais importantes objetivos da Endodontia é devolver ao sistema de canais radiculares a condição asséptica, eliminar a microbiota patogênica para a possível devolução do dente a sua função. O insucesso do tratamento endodôntico está muitas vezes associado à permanência de microrganismos viáveis no sistema de canais radiculares ou nos túbulos dentinários, devido à ineficiência das manobras antimicrobianas realizadas durante o tratamento, ou pela contaminação do canal durante as fases de manipulação e ainda pela ineficiência do selamento coronário. Estudos demonstraram resultados promissores da ação fototérmica da irradiação dos lasers em alta intensidade na redução microbiana em Endodontia (6,7,8,9,10).

Diferentes comprimentos de onda são utilizados em Endodontia, de acordo com o propósito de aplicação. Os lasers de CO₂ e Nd: YAG foram os primeiros lasers utilizados em experimentos endodônticos (11, 12). Atualmente destacam-se os lasers Nd:YAG, Er:YAG,

Er:YSGG e diodos.

Os lasers de diodo semicondutores (GaAs, GaAlAs) têm assumido destaque em Endodontia, especialmente por sua ação antimicrobiana. A radiação pode ser emitida no modo contínuo ou pulsado e, conforme a aplicação clínica, a fibra poderá estar ou não em contato com o tecido. Geralmente são equipamentos compactos, portáteis, ergonômicos e econômicos, quando comparados a outros equipamentos. O comprimento de onda desses diodos está em geral entre 805 e 980 nm. Para emissão em 980 nm a profundidade de penetração é próxima àquela conseguida pelo Nd: YAG (1.064 nm) (13).

Entre as aplicações dos lasers de diodo na Odontologia, como coagulação de lesões superficiais e excisão de tumores malignos em tecidos moles, destaca-se a sua ação antimicrobiana na redução da microbiota de bolsas periodontais e de canais radiculares infectados (14, 15).

As pesquisas laboratoriais e clínicas buscam avaliar os efeitos dos lasers, com o objetivo de analisar os resultados do sucesso, quando da sua incorporação como coadjuvante a terapêutica endodôntica. No entanto, o conhecimento sobre as reais vantagens e desvantagens biológicas do uso dessa tecnologia ainda não são totalmente conhecidas. A maior precaução quando do uso dos lasers *in vivo* refere-se, especialmente, aos danos térmicos que podem ser causados quando parâmetros inadequados são utilizados (16, 17) .

A quantidade de estudos que avaliou a ação do laser de diodo em Endodontia ainda é discreta, especialmente quando se compara a superioridade do número de publicações de estudos que avaliaram a ação de outros comprimentos de onda, como Nd: YAG e Er: YAG. Como exemplo, discretas foram as investigações que avaliaram a ação dos lasers de diodo na redução microbiana *in vivo*; além disso, nenhum deles utilizou técnicas moleculares para análise mais efetiva da redução microbiana alcançada por esse comprimento de onda.

A aparente promissora relação entre os lasers de diodo e as condutas tradicionais do

tratamento endodôntico foi a principal motivação para realização deste estudo. Buscou-se investigar os efeitos dessa tecnologia sob diferentes aspectos de observação, como o aumento da temperatura, as alterações morfológicas, o selamento marginal apical e a redução microbiana, quando da associação do laser de diodo à terapêutica endodôntica preconizada pela Faculdade de Odontologia da USP.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Efeitos térmicos da irradiação laser intracanal

2.1.1 Considerações biofísicas

O grau e a extensão dos efeitos térmicos da irradiação laser nos tecidos biológicos estão relacionados às propriedades ópticas e térmicas dos mesmos (coeficientes de absorção e espalhamento, capacidade e condutividade térmicas) assim como com os parâmetros de irradiação do laser (comprimento de onda, potência, energia, irradiância).

De acordo com o tempo de irradiação no tecido isto é o tempo de interação e a irradiância do laser na superfície ou do volume de interação (densidade de potência efetiva), os efeitos resultantes da interação laser/tecido podem ser classificados em: efeitos fotoquímicos (10 – 1000 s; 10^{-3} – 1 W/cm²); efeitos fototérmicos (1 ms – 100 s; 1 – 10⁶ W/cm²) ou efeitos fotomecânicos e fotoionizantes (10 ps – 100 ns; 10^8 – 10¹² W/cm²) (18).

Os mecanismos fototérmicos da irradiação laser são importantes na coagulação de vasos, na vaporização, no corte de tecido, na carbonização e na fusão de tecidos (18, 19). A tabela 2.1 resume os efeitos térmicos da irradiação laser nos tecidos biológicos.

Tabela 2.1 – Efeitos térmicos da irradiação laser nos tecidos biológicos (19)

| Temperatura | Efeitos biológicos |
|--------------------|--|
| 37 °C | Normal |
| 45 °C | Hipertermia |
| 50 °C | Redução da atividade enzimática |
| 60 °C | Desnaturação de proteínas e colágeno Coagulação |
| 80 °C | Permeabilização de membranas |
| 100 °C | Vaporização, ablação |
| > 150 °C | Carbonização |
| > 300 °C | Fusão |

O aumento exacerbado de temperatura no tecido biológico pode promover a desnaturação de proteínas, e a conseqüente necrose tecidual. A ordenação estrutural das proteínas é estável em temperatura corpórea, mas as temperaturas superiores a 50 °C levam as moléculas ao estado ativo de energia, podendo alcançar irreversivelmente o estado de desnaturação (20).

A Figura 2.1 ilustra resumidamente os parâmetros envolvidos na origem dos efeitos térmicos quando o tecido biológico é irradiado.

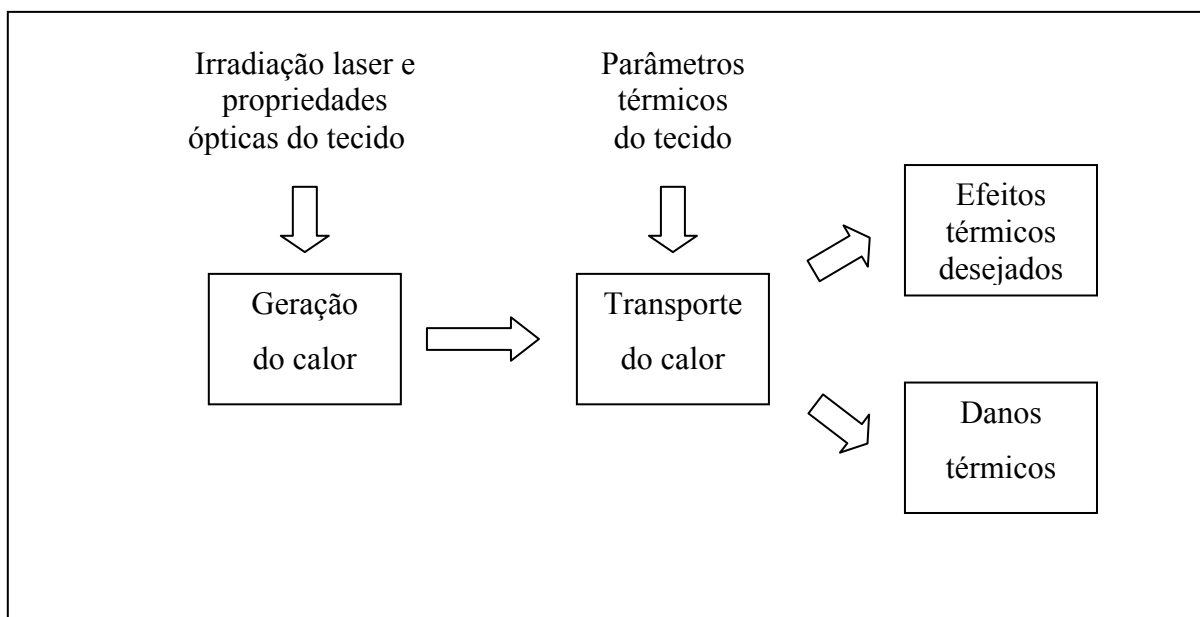


Figura 2.1 – Representação esquemática dos parâmetros físicos e biológicos envolvidos na geração de efeitos térmicos

O aquecimento gerado no tecido está relacionado à absorção da radiação laser. O comprimento de onda e a sua relação de absorção/espalhamento no tecido biológico são parâmetros relevantes na formação de calor (19). O coeficiente de absorção (μ_a) refere-se à taxa de perda de energia, por absorção dos fótons, a cada unidade de comprimento. Portanto, quando o coeficiente de absorção é baixo pouca absorção de fótons ocorre naquele tecido; sendo o inverso verdadeiro. Mediante a complexidade estrutural dos tecidos biológicos, o coeficiente de espalhamento (μ_s) do tecido também deve ser considerado. O coeficiente de espalhamento indica a taxa de perda de energia, por espalhamento dos fótons, a cada unidade de comprimento. O espalhamento assume maior importância quando a absorção de um dado comprimento de onda pelo tecido é reduzida (21).

As propriedades térmicas do tecido, especialmente a condutividade térmica, são fatores a serem considerados no transporte do calor gerado no tecido irradiado. Essa

propriedade consiste no primeiro mecanismo responsável pela transferência do calor gerado para regiões que não foram diretamente expostas à irradiação.

Dada a diversidade dos fatores envolvidos, a fundamentação e a compreensão teórica dos efeitos térmicos da irradiação nos tecidos biológicos são bastante complexas. O texto anteriormente descrito discorreu resumidamente sobre algumas considerações dos principais fatores envolvidos no processo recomendam-se para leitura mais específica as referências citadas neste.

2.1.2 Considerações clínicas

O uso clínico do laser em Endodontia prescinde da análise do risco de injúria aos tecidos periodontais adjacentes, pelo aumento da temperatura na superfície radicular externa. Como exposto anteriormente, o aumento excessivo da temperatura pode provocar a desnaturação protéica e a inatividade da função celular. Embora a temperatura de desnaturação da fosfatase alcalina (56 °C) pareça ser um valor de limite crítico aos danos celulares, a elevação da temperatura a 53 °C já promove danos irreversíveis ao tecido ósseo (22).

As alterações ósseas ocorridas em tibia de cães, quando a temperatura foi aumentada a 50 °C por 1 minuto, a 47 °C por 5 minutos e a 47 °C por 1 minuto, é considerado referência aos estudos de avaliação de temperatura. A condição de aquecimento a 47 °C durante 1 minuto gerou alterações discretas no tecido ósseo, quando comparado às outras temperaturas de aquecimento. Foi observada discreta reabsorção óssea, muitas vezes confundida com o processo fisiológico de remodelação do tecido, com mínimo predomínio da fase de

reabsorção. Este estudo indica que uma variação de temperatura (ΔT) de até 10 °C é tolerada pelas estruturas periodontais (23).

Vários estudos investigaram os efeitos de diferentes comprimentos de onda na irradiação do canal radicular o que demonstra o interesse da comunidade científica na investigação da segurança do aumento de temperatura aos tecidos periodontais.

O alargamento do canal radicular pelo uso do laser de Ho: YAG (2,09 μm) exige uso de fibras ópticas com diâmetros crescentes. A variação de temperatura nas porções apical e cervical da superfície radicular externa monitorada pelo uso de termopares, durante o alargamento do canal radicular pelo laser Ho: YAG, foi inferior a 10 °C quando as condições de potência do laser (0,5; 0,75 e 1,0 W) e o diâmetro da fibra (140, 200, 245, 300, 355 e 410 μm) foram variadas. As menores variações de temperatura observadas ($\Delta T < 1,5$ °C) estiveram relacionadas à fibra de maior diâmetro, mesmo na maior potência de irradiação (24,25,26). O tempo de resfriamento entre os períodos de irradiação para alargamento do canal foi de pelo menos 10 minutos (25).

O comportamento do aumento da temperatura em canais irradiados com laser de Er: YAG (2,94 μm), variando fluência e diâmetro da fibra, indicou que as amostras irradiadas com fibra de maior diâmetro (470 μm) e maior regime de energia (500 mJ/pulso) exibiram aumento de temperatura inferior a 6 °C. Vale ressaltar que durante a irradiação o canal radicular permaneceu úmido pelo *spray* de água (20 ml/mim) (27). A avaliação do aumento de temperatura em canais radiculares artificiais criados em blocos de dentina bovina demonstrou a interferência da geometria das fibras utilizadas na irradiação intracanal no aumento de temperatura. As fibras cônicas promoveram menor aumento de temperatura que as fibras cilíndricas na condição de energia de 30 mJ e 10 Hz. Os autores ressaltaram a dispersão homogênea da energia pelas fibras cônicas, evitando a concentração pontual da energia (28).

O estudo termográfico de amostras irradiadas pelo laser Er;Cr:YSGG revelou expressivo aumento da temperatura ($T > 57\text{ }^{\circ}\text{C}$) na superfície radicular externa, quando o canal foi irradiado na ausência de refrigeração do tecido pelo *spray* de água do laser e na maior potência investigada (6W) (29). O aumento da temperatura na porção apical da raiz também foi relacionado à espessura do remanescente do tecido dentinário. A irradiação do canal radicular pelo laser Er;Cr:YSGG determinou maior aumento de temperatura ($7,75\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,07\text{ }^{\circ}\text{C}$) quando o canal foi preparado com limas de maior diâmetro (nº 40) e irradiado com maior potência (5W) sob o regime de refrigeração ar/água recomendado pelo fabricante (30).

A irradiação do canal radicular deve ser dinâmica para minimizar os efeitos térmicos. As temperaturas medidas na porção apical alcançaram valores de $6\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $18\text{ }^{\circ}\text{C}$, quando o canal radicular foi irradiado pelo laser de diodo (4 W/ 50 Hz/ taxa de repetição 0,01 s) e a fibra foi mantida sem movimentação naquela região por 1, 2 e 3 segundos, respectivamente. No entanto, quando a fibra foi movimentada circularmente no canal por até 10 segundos, a temperatura máxima medida foi de $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ na região apical (7).

A avaliação do aumento de temperatura em canais radiculares irradiados pelo laser de diodo, sob regime de emissão contínuo, com potências distintas (1,5; 3,0 e 4,5 W) foi feita inserindo a fibra ($\varnothing = 200\text{ }\mu\text{m}$) no canal e movimentando-a por um motor de passo no sentido coroa – ápice por 10 segundos e no sentido ápice – coroa por outros 10 segundos, numa velocidade de 1,2 mm/s. O tempo total de irradiação foi de 60 segundos, divididos em três ciclos, sem nenhuma recomendação quanto ao tempo de resfriamento do tecido. Os termopares foram inseridos na superfície radicular externa em regiões cujo remanescente dentinário possuía 0,5, 1,0 e 2,0 mm. Os aumentos da temperatura registrados não excederam $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ em nenhuma das condições de potência de irradiação e remanescente dentinário investigadas. Os autores ressaltaram as limitações do estudo *in vitro*, que não reproduz a absorção da energia laser pelos tecidos circunvizinhos à raiz (31).

O aquecimento e o resfriamento na superfície externa da raiz foi investigado quando o canal foi irradiado com laser de diodo (810 nm) sob diferentes condições de potência, regimes de emissão e períodos de exposição e resfriamento. O tempo total de irradiação do canal radicular foi de 20 segundos por canal, divididos em quatro ciclos de irradiação de 5 segundos e três tempos de resfriamento de 5 segundos. De forma geral, as condições investigadas no estudo sugeriram que para cada 5 segundos de irradiação, 5 segundos de resfriamento são necessários para evitar o aumento excessivo da temperatura, especialmente quando a emissão laser é contínua ($P = 0,6$ a $1W$). Os autores também observaram relação indireta entre o aumento de temperatura e a diminuição da espessura dentinária após 20 segundos de irradiação. O aumento da temperatura nas fatias de dentina, com espessura de 1 e 2 mm, não excedeu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, nem mesmo quando o laser foi operado no regime contínuo de emissão com potência entre 1,0 e 1,5 W (32).

A temperatura mensurada na superfície radicular externa por sistema termográfico foi estatisticamente maior quando o canal radicular foi irradiado pelo laser de diodo (980 nm) com fibra de maior diâmetro. Resguardando as condições de irradiação (5 W, emissão contínua, 7 segundos de irradiação), o aumento máximo de temperatura registrado no terço médio das amostras irradiadas com fibra de $\varnothing = 550\text{ }\mu\text{m}$ foi $8,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto nas amostras irradiadas pela fibra de $\varnothing = 365\text{ }\mu\text{m}$ a temperatura registrada foi de $6,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (33).

O monitoramento do aumento de temperatura por termopares em fatias de dentina com espessura de 1 mm não excedeu $5,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante a irradiação com laser de diodo (980 nm). O aumento médio de temperatura foi de $3,8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ no menor parâmetro de irradiação (1 W/ 15 Hz/ 400 μm) e de $4,7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ no maior parâmetro (1,5 W/ 15 Hz/ 400 μm) (34).

O aumento de temperatura, resultante da irradiação de fatias de dentina humana pelo laser de diodo (810 nm), decresce com o aumento da espessura da camada de dentina. As amostras de dentina com 500 μm de espessura exibiram um aumento de temperatura de $5,9\text{ }^{\circ}\text{C}$

e 8,1 °C após serem irradiadas pelo laser de diodo sob regime de emissão contínuo e potências de 5,0 e 7,0 W, respectivamente. As demais condições de irradiação (0,5; 1,0 e 3,0 W) não promoveram aumento de temperatura superior a 5,5 °C (35).

O monitoramento da variação de temperatura pelo sistema termográfico na superfície radicular externa, quando o canal radicular foi irradiado com laser de diodo (810 nm) sob emissão contínua e pulsada, demonstrou que a variação máxima da temperatura mediana foi de 8,6 °C, no regime contínuo de emissão (2,5 W/ Ø = 400 µm/ 1989 W/cm²). Enquanto no regime de emissão pulsado (50 ms acionado/ 50 ms desligado), a variação máxima da temperatura mediana foi de 3,3 °C. Os autores recomendaram 20 segundos de resfriamento entre as irradiações, evitando o acúmulo de calor especialmente na região apical¹.

2.2 Alterações morfológicas na dentina das paredes do canal radicular após irradiação laser

Diversos estudos demonstram a grande variabilidade de alterações morfológicas no tecido dentinário promovida pela irradiação laser, de acordo com o comprimento de onda e os parâmetros utilizados.

De forma geral, os lasers que possuem comprimento de onda na região próxima a 3 µm (Er:YAG e Er;Cr:YSGG) promovem ablação do tecido dentinário, remoção de *smear layer* e exposição dos túbulos dentinários. Em contrapartida, os lasers na região de 1 µm

¹ Ribeiro AC, Calvo GE, Antoniazzi JH, Moritz A, Zezell DM. Effects of diode laser (810 nm) irradiation on root canal walls: thermographic and morphological studies. J Endod. (aceito para publicação em 07-09- 2006).

(Nd:YAG e diodo) promovem a fusão da hidroxiapatita, produzindo áreas de recristalização nas paredes do canal radicular e obliteração dos túbulos dentinários.

A irradiação do canal radicular no sentido apicocervical pelo laser Er;Cr:YSGG (2W, 22,6 J/cm²; 3W, 33,9 J/cm²; 5 W, 56,6 J/cm²), sob refrigeração, removeu os resíduos resultantes do preparo químico-cirúrgico e determinou a abertura dos túbulos dentinários nas condições testadas. Sinais de carbonização e fusão na dentina não foram observados, mesmo nas amostras irradiadas com maior fluência (30). Entretanto, quando a dentina foi irradiada pelo referido laser, sem refrigeração, foram observadas incompleta remoção de debris e *smear layer*, formação de microcrateras e regiões fusionadas ou carbonizadas (29, 36). As regiões de fusão e carbonização também foram evidenciadas em canais radiculares irradiados (3 W, 20 Hz, 10 s) ou preparados (2 W, 20 Hz, 60 s) pelo laser de Er;Cr:YSGG, mesmo sob o regime de refrigeração, promovendo a obliteração dos túbulos dentinários pelo tecido fusionado (37, 38).

A irradiação em direção perpendicular às paredes do canal radicular com laser de Er:YAG (1 W/ 100 mJ/ 10 Hz) por 3 e 5 segundos promoveu a remoção de debris e *smear layer* e desobstrução dos túbulos dentinários, especialmente quando a irradiação transcorreu por 3 segundos. O maior tempo de irradiação promoveu maior remoção da dentina pelo processo de ablação (39).

A remoção de *smear layer* e a desobstrução dos túbulos dentinários foram beneficiadas durante a irradiação do canal radicular pelo laser de Er:YAG com fibra de porção distal cônica. Densa camada de *smear layer* foi observada quando o canal foi irradiado com fibra de porção distal lisa, resguardando os mesmos parâmetros de irradiação (30 mJ, 10 Hz) utilizados durante a irradiação com a fibra cônica. Entretanto, quando os parâmetros de irradiação foram modificados para 20 mJ/10 Hz, as alterações morfológicas mantiveram o mesmo padrão para as duas fibras ópticas (28).

As alterações morfológicas observadas após o preparo de retrocavidades com laser Er:YAG e Nd:YAG demonstraram as diferenças promovidas pelos dois lasers. Enquanto, as amostras irradiadas pelo laser de Er:YAG (120 mJ/ 4 Hz) exibiram túbulos dentinários abertos e superfície dentinária sem indícios de *smear layer*, crateras, fissuras ou fusão as amostras preparadas pelo laser de Nd:YAG (1,5 W/ 100 mJ/ 15 Hz) demonstraram superfícies limpas, sem *smear layer*, mas com túbulos dentinários obliterados pela fusão da dentina (40).

O padrão morfológico promovido pela irradiação do canal radicular pelo laser de Nd:YAG promoveu descontínua fusão e recristalização da dentina, com parcial selamento dos túbulos dentinários na superfície irradiada (41, 42).

A pigmentação da dentina por corante não alterou as características morfológicas da dentina irradiada pelo laser Nd:YAG (1,5 W/ 100 mJ/ 15 Hz). Fusão e solidificação da dentina apical foram observadas em amostras pigmentadas ou isentas de pigmento. Nas amostras pigmentadas, a maior absorção da energia pelo pigmento determinou ablação ou fusão do *smear layer*, e assim a menor quantidade desse comparado com as amostras não pigmentadas. Contudo não foi constatada diferença significativa entre os grupos (43).

A irradiação do canal radicular pelo laser de diodo (980 nm), a 5 W de potência por 7 segundos, promoveu remoção de *smear layer* e debris, abertura dos túbulos dentinários e parcial fusão e recristalização das paredes dentinárias. A avaliação estatística da quantidade remanescente de *smear layer* nas amostras irradiadas foi significativamente menor no grupo controle, entretanto não foram observadas diferenças estatísticas entre as amostras irradiadas com fibras de diferentes diâmetros (33).

O selamento da abertura dos túbulos dentinários no terço apical dos canais radiculares irradiados com laser de diodo (810 nm) foi observado independente do regime de emissão do laser e dos parâmetros utilizados: contínuo (2,5 W/ Ø=400 µm/ I = 1989 W/cm²) ou pulsado (P = 1.25 W/ 10 Hz/ Ø=400 µm/ I = 994 W/cm²/ 50 ms ativado/50 ms desativado). Os túbulos

dentínários permaneceram abertos e as áreas sugestivas de fusão foram reduzidas no terço médio das amostras em ambos os grupos².

O ângulo de irradiação influencia as alterações morfológicas promovidas pela irradiação laser no canal radicular, principalmente na região cervical. A maioria das fibras, utilizadas na irradiação do canal radicular, exibe maior concentração de energia na porção axial e menor, ou nenhuma, emissão de energia lateralmente à fibra. Assim, as alterações morfológicas na região apical são beneficiadas pela emissão axial de energia pela fibra e conseqüente concentração numa região de reduzida área. A maior amplitude do canal na região cervical permite uma orientação mais perpendicular da fibra às paredes, entretanto na região média a disposição da fibra é paralela às paredes, dificultando as alterações morfológicas nessa região (44).

A movimentação circular da fibra durante a irradiação do canal radicular pelo laser Nd:YAG, ao longo de sua extensão, determinou o surgimento de formações globulares e regiões de fusão, recristalização e ebulição na dentina apenas na condição de maior energia e freqüência de irradiação (3 W/ 20 Hz). Nas condições de menor energia (1 W/ 10 Hz; 1 W/ 20 Hz; 3 W/ 10 Hz) as áreas de fusão e recristalização da hidroxiapatita não foram observadas. A irradiação perpendicular do canal, quando as amostras foram seccionadas, promoveu as modificações morfológicas citadas acima em todos os grupos experimentais (45).

A avaliação morfológica das regiões apical e média de canais radiculares irradiados pelo laser de Nd:YAG revelou túbulos dentínários abertos e raras regiões de fusão, quando a irradiação foi circular ao longo da extensão do canal, independente do menor (1,5 W/ 100 mJ/ 15Hz) ou maior (2,4 W/ 160 mJ/ 15 Hz) parâmetro de irradiação. Em contrapartida, extensivas áreas de fusão e recristalização da dentina foram observadas nas amostras

² Ribeiro AC, Calvo GE, Antoniazzi JH, Moritz A, Zezell DM. Effects of diode laser (810 nm) irradiation on root canal walls: thermographic and morphological studies. J Endod. (aceito para publicação em 07-09- 2006).

irradiadas perpendicularmente, em ambas as condições de irradiação. A análise estatística comprovou as diferenças morfológicas entre as formas de irradiação, circular e perpendicular, mas não constatou diferenças entre as alterações observadas nas regiões apical, média e cervical (46).

2.3 Efeitos da irradiação do canal radicular na infiltração marginal apical

2.3.1 Considerações sobre a remoção do *smear layer* das paredes do canal radicular

O tratamento endodôntico tem como um dos principais objetivos promover eficiente limpeza do canal radicular, assim como o seu adequado preparo permitindo o posterior selamento tridimensional e a máxima impermeabilização daquele espaço. A evidência de infiltração apical de lipopolissacarídeos de *P. gingivalis*, principal fator de virulência das bactérias gram-negativas, em canais radiculares obturados por guta-percha termoplastificada, ressalta a importância do perfeito selamento marginal apical, para minimizar o possível risco de recontaminação (47).

Independentemente dos instrumentos ou das técnicas utilizadas no preparo do canal radicular, forma-se uma camada de *smear layer* rica em substâncias orgânicas e inorgânicas, incluindo restos celulares, material necrótico e microrganismos. Uma camada superficial de *smear layer* com aproximadamente 1 a 2 μm de espessura deposita-se sobre as paredes do canal, e abaixo desta, uma camada profunda invade os túbulos dentinários por distâncias de 6 a 40 μm (48).

Ainda não existe uma concordância universal sobre a remoção do *smear layer*, mas considerável número de pesquisadores recomenda a sua remoção para beneficiar a difusão e ação da medicação intracanal, assim como o selamento do canal radicular pelos materiais obturadores (49, 50). A remoção do *smear layer* poderá ser realizada por agentes químicos, mecânicos ou pela irradiação laser.

O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é a substância química mais empregada na remoção do *smear layer*. Trata-se de um agente quelante com capacidade de unir-se e inativar íons metálicos pela formação de complexo estável entre os pares de elétrons livres do agente quelante com o íon cálcio. Quando todos os íons disponíveis são unidos é alcançado o equilíbrio, não ocorrendo dissolução da dentina a partir deste momento. A ação dos agentes quelantes em Endodontia, quer na forma de apresentação líquida ou cremosa, promove a desmineralização e redução da dureza da dentina, a dissolução do *smear layer* e o aumento da permeabilidade dentinária (50).

A extensão da desmineralização promovida pela ação do EDTA depende do tempo de ação da substância sobre a dentina. A solução de EDTA a 15 % (pH 7,3) foi capaz de desmineralizar uma camada de 20 a 30 μm , após um período de 5 min. A ação do EDTA é considerada autolimitante, pois sob condições de pH neutro, a troca do cálcio da dentina pelo hidrogênio do EDTA resulta no decréscimo do pH do meio. O meio ácido diminui gradativamente a eficiência do EDTA com o tempo, e por outro lado, afeta a solubilidade da dentina pela dissolução da hidroxiapatita (51).

A exposição da dentina à solução de EDTA a 17 % por 10 minutos determinou severas erosões na dentina peritubular e intratubular, enquanto a irrigação do canal radicular com de 10 ml da solução por 1 minuto foi suficiente para remover o *smear layer*, permitindo a limpeza do canal e desobstrução dos túbulos (52). Estudos demonstraram que a ação de limpeza promovida pelo EDTA foi mais eficiente nos terços médio e cervical do que no terço

apical, notando-se uma redução do número de túbulos dentinários abertos nessa região (53,54,55).

A ação da irradiação laser na remoção do *smear layer* dependerá do comprimento de onda e dos parâmetros utilizados. O comprimento de onda dos lasers Er:YAG (2,94 μm) e Er,Cr:YSGG (2,78 μm) coincide com a frequência ressonante das oscilações vibracionais das moléculas de água. Além disso, o maior coeficiente de absorção desses comprimentos de onda pela água beneficia a evaporação do conteúdo aquoso da dentina com relativo gradiente de pressão (19). Assim, as microexplosões que caracterizam o fenômeno de ablação deslocam a estrutura de hidroxiapatita e da camada de *smear layer*, beneficiando a remoção desta e a desobstrução da entrada dos túbulos.

A remoção da camada de *smear layer* pelos lasers de diodo e Nd:YAG ocorre por outro mecanismo, que está fundamentado nos efeitos fototérmicos promovidos pela absorção desses comprimentos de onda pela hidroxiapatita. O aumento de temperatura ($T > 300\text{ }^\circ\text{C}$), resultante da absorção da energia emitida pelos lasers pela hidroxiapatita, determina a fusão e posterior recristalização da dentina (18). Dessa forma, a camada de *smear layer* adjacente à região irradiada será derretida obliterando a entrada dos túbulos dentinários.

Conforme foi descrito no item 2.3, diversos estudos exemplificam a ação dos lasers na remoção da camada de *smear layer* que recobre os túbulos dentinários.

2.3.2 Considerações sobre a infiltração marginal apical após o tratamento das paredes dentinárias por agentes químicos ou pela irradiação laser

Após a remoção da camada de *smear layer* pela ação do EDTA a 17% e a obturação

dos canais com diferentes materiais obturadores (Ketac-Endo, AH26, AH Plus, Apexit e Diaket), não foi observada diferença significativa entre os níveis de infiltração mensurados nos grupos experimentais pela técnica de transporte de fluido (56). Os estudos constataram o benefício da irrigação do canal radicular com solução de EDTA a 17% comparado ao uso de solução de NaOCl a 2,5%, dado o melhor selamento promovido pelos cimentos obturadores (AH26 e Roeko-Seal) nas regiões apical e coronária e os reduzidos índices de infiltração. No entanto, os autores também não observaram diferenças significativas entre os índices de infiltração promovidos pelos cimentos obturadores (57).

O tratamento das paredes dentinárias com solução de EDTA a 15 %, e a conseqüente remoção de *smear layer*, demonstrou menores índices de infiltração de corante após a obturação do canal radicular, quando comparado ao grupo controle, irrigado com água destilada. O Sealer 26 foi o cimento obturador com menor infiltração apical de corante ($0,12 \pm 0,12$ mm), seguido pelo N-Rickert ($0,29 \pm 0,30$ mm). Os testes estatísticos comprovaram as diferenças estatísticas significantes entre os níveis de infiltração dos cimentos obturadores testados (Sealer 26 e N-Rickert, Sealapex e EndoFill) (58).

A média da penetração linear do corante pelo forame apical foi menor nos canais obturados pelo AH Plus quando comparado aos grupos obturados pelo cimentos Ketac-endo e Endometasone. O bom resultado alcançado pelo AH Plus justifica-se pela remoção prévia do *smear layer* pelo uso de solução quelante (Na-EDTA a 15 %) (59).

A capacidade de selamento do cimento obturador não dever ser avaliada apenas por um período imediato à obturação. Ao longo do tempo, algumas alterações físico-químicas do cimento podem determinar a diminuição na capacidade de selamento, antes considerada satisfatório. Um estudo longitudinal avaliou a capacidade de selamento de cimentos obturadores pela técnica de transporte de fluidos, após o período de 7, 14 e 21 dias. Vale ressaltar que a camada de *smear layer* não foi removida neste estudo. Os resultados

comprovaram pela análise estatística a redução gradual da infiltração ao longo do tempo. O cimento Sealapex apresentou a melhor capacidade de selamento nos tempos investigados, existindo diferença significativa entre esse material e os demais. O cimento AH Plus demonstrou capacidade de selamento próxima ao Sealapex, no entanto não foi observada diferença significativa com os resultados apurados com o Rocanal 2 e o RC Sealer (60).

O laser de Er:YAG é considerado efetivo às aplicações endodônticas por promover remoção da camada de *smear layer* e o aumento na permeabilidade dentinária, especialmente quando água é usada como agente irrigador (39, 61, 62). As paredes dentinárias irradiadas com laser de Nd:YAG exibem baixa permeabilidade dentinária, pela fusão da hidroxiapatita e obliteração dos túbulos dentinários (44, 61).

Os índices de infiltração exibiram menor infiltração do corante quando o canal radicular foi obturado com os cimentos AH Plus e N-Rickert, nos grupos controle e grupo laser Er:YAG. Enquanto os maiores índices de infiltração foram conferidos aos cimentos Sealapex e Ketac-Endo. Embora o método de remoção da camada de *smear layer*, EDTA-T ou laser Er:YAG, não tivesse interferido no selamento apical, foi observado que a irradiação do canal radicular favoreceu maiores índices de infiltração do cimento Sealapex quando comparado ao seu controle (63).

Estima-se que os cimentos obturadores possuam melhor adaptação às paredes dentinárias irradiadas pelo laser de Er:YAG e menores índices de infiltração marginal apical sejam constatados. Em contrapartida, não apenas a remoção da camada de *smear layer* influencia o comportamento da infiltração apical, como também a diminuição da permeabilidade dentinária. Os níveis de infiltração observados neste estudo foram menores nos grupos irradiados pelo laser de Nd:YAG, especialmente quando o canal foi pigmentado com corante, do que nos grupos irradiados pelos laser de Er:YAG e argônio. Os autores justificam os menores índices de infiltração nos grupos irradiados pelo laser de Nd:YAG pela

redução da permeabilidade dentinária e pelo íntimo contato do cimento obturador (Canal N) com as paredes do canal radicular (64).

A irradiação do canal radicular pelo laser de Nd:YAG, previamente à obturação, proporcionou menores valores de infiltração apical que a solução de EDTA ($p < 0,05$), independente do cimento utilizado. A obturação dos canais irradiados pelo cimento AH Plus apresentou menor infiltração apical ($0,99 \pm 0,68$ mm), seguido do grupo laser obturado com Endofill ($1,93 \pm 1,00$ mm), EDTA + AH Plus ($2,54 \pm 0,84$ mm) e EDTA + Endofill ($4,20 \pm 1,52$ mm) (65).

A avaliação comparativa da permeabilidade marginal apical promovida pelos lasers Nd:YAG e diodo, revelou que o primeiro promove de forma significativa menor permeabilidade independentemente do material obturador utilizado, AH Plus ou Endo REZ. A maior capacidade de selamento no estudo foi conferida ao grupo irradiado com o laser Nd:YAG e obturado com o cimento AH Plus, em contrapartida, o pior resultado foi obtido pelo grupo tratado com EDTA-T e obturado com o cimento Endo REZ. No grupo diodo o melhor selamento foi conferido às amostras obturadas com cimento AH Plus do que com o cimento Endo Rez (66).

2.4 Efeitos da irradiação laser na redução da microbiota endodôntica

2.4.1 Caracterização da microbiota nas infecções endodônticas

O sucesso da terapia endodôntica varia de 83 % até 96 % dependendo das condições

do tecido pulpar no início do tratamento (67, 68). O índice de sucesso alcança nos casos de periodontite apical aguda, de periodontite apical crônica e de inflamação e degeneração pulpar os índices de sucesso assumem os respectivos valores: 88 %, 98 % e 95 % (69).

Por mais de um século, as técnicas de cultura de microrganismos são utilizadas na identificação da microbiota de várias patologias humanas. A principal vantagem das técnicas de cultura refere-se à possibilidade de identificar e quantificar um grande número de espécies microbianas em uma amostra. Além disso, as técnicas permitem detectar a suscetibilidade de isolados microbianos e investigar a sua fisiologia e patogenicidade (70).

A maior prevalência de microrganismos em canais radiculares infectados corresponde às bactérias anaeróbias estritas com menor frequência têm-se as anaeróbias facultativas e raramente os aeróbios. As condições do ecossistema nos canais infectados (nutrientes, oxigênio, relações bacterianas) favorecem o crescimento dos anaeróbios estritos, os quais são capazes de fermentar aminoácidos e peptídeos, enquanto a maioria das bactérias obtém energia da fermentação de carboidratos, portanto os microrganismos anaeróbios são mais seletivos quanto à fonte de nutrientes (71).

As infecções endodônticas primárias são causadas pela colonização da cavidade pulpar por microrganismos após a necrose da polpa dental. As técnicas de cultura revelaram que a microbiota da infecção primária corresponde a um consórcio de microrganismos, com uma média de 3 a 6 espécies microbianas por canal, predominantemente anaeróbios gram-negativos (*Fusobacterium*, *Phorphyromonas*, *Prevotella* e *Campylobacter*) (72).

A avaliação de 41 canais radiculares portadores de infecção primária revelou a presença significativa de *P. micro*, *P. prevotii*, *F. necrophorum*, *P. intermedia* ou *nigrescens*, *S. constellatus*, *S. anginosus*, *S. sanguis*, *F. nucleatum*, *Gemella morbillorum*, *S. mitis*, *P. gingivalis*, *P. loescheii* e *Lactobacillus acidophilus*. O *E. faecalis* também foi encontrado em dois casos de infecção primária, embora sua prevalência tivesse sido maior nos casos de

infecção persistente, totalizando 6 dos 19 casos (73).

As infecções endodônticas secundárias são causadas por microrganismos que não estão presentes na infecção primária, mas que penetraram e colonizaram o sistema de canais radiculares durante o tratamento, entre as sessões, ou após a conclusão do tratamento endodôntico. As infecções persistentes caracterizam-se pela permanência no canal radicular de microrganismos, membros das infecções primária ou secundária, os quais resistiram aos procedimentos antimicrobianos realizados durante o tratamento endodôntico (74).

As técnicas de cultura demonstraram que as infecções secundárias ou persistentes caracterizam-se pela presença de uma ou duas espécies de bactérias gram-positivas facultativas, particularmente o *E. faecalis* (73). Fungos também podem ser isolados de amostras de infecções secundárias ou persistentes numa frequência significativamente maior do que nas infecções primárias (75).

Sugere-se que a maior prevalência de bactérias gram-positivas nos casos de infecções endodônticas deve-se à maior resistência desses microrganismos aos procedimentos antimicrobianos realizados durante a terapêutica endodôntica. Os anaeróbios facultativos, especialmente os gram-positivos, podem sobreviver com baixa atividade metabólica por um longo período de tempo. Fatores como infiltração coronária, durante ou após o tratamento endodôntico, podem modificar as condições nutricionais daquele ecossistema e contribuir para o crescimento dos microrganismos no interior do canal radicular (76).

Os estudos também referem diferença entre a microbiota dos casos sintomáticos e assintomáticos. Os sintomas agudos (presença ou história de dor, sensibilidade à percussão e inflamação) foram associados aos anaeróbios gram-negativos, especialmente *Prevotella*, *Porphyromonas* spp. e fusobactérias (73).

As técnicas de biologia molecular têm contribuído significativamente à Endodontia na identificação de vários patógenos antes desconhecidos ou considerados não cultiváveis,

colaborando para identificação e compreensão da patogenicidade da microbiota associada aos casos de infecções primária, secundária e persistente (77,78,79).

Entre as vantagens das técnicas moleculares destacam-se especificidade e sensibilidade, que permitem avaliar com maior precisão a prevalência dos microrganismos nas patologias, algumas vezes subestimada pelas técnicas de cultura. Estima-se que aproximadamente 50% da microbiota bucal não é identificada pelas técnicas de cultura (80).

Nos últimos anos, a avaliação por PCR da microbiota de canais infectados revelou identificação de novos filotipos em casos de infecção primária e secundária com alta prevalência. A avaliação da seqüência de clones do gene 16S rRNA de amostras de dentes humanos portadores de polpa necrosada e reação periapical crônica revelou a identificação de 46 unidades taxonômicas distintas, entre as quais quatro clones foram classificados como novos representantes da ordem *Clostridiales*, incluindo uma nova espécie putativa de *Mogibacterium* (81).

Siqueira compilou os resultados de vários autores que identificaram por técnicas moleculares os microrganismos presentes em infecções endodônticas primárias. A prevalência dos filos das bactérias encontradas, nesses casos de infecção, assume, em ordem crescente, a seguinte disposição: Fusobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Spirochaetes e Bacteroidetes (82).

Entre os microrganismos associados às patologias endodônticas, aquele submetido ao maior número de pesquisa é o *Enterococcus faecalis*, um microrganismo anaeróbio facultativo gram-positivo freqüentemente isolado nos casos de lesões persistentes. A presença do *E. faecalis* pode ser constatada em diferentes sítios da cavidade bucal, sendo a língua o sítio com maior prevalência (43 %), seguida pelo sulco gengival (14 %), saliva (10 %) e canal radicular (10 %). A maior proporção do microrganismo encontra-se em pacientes portadores de gengivite/periodontite (73 %) do que naqueles com periodonto saudável (20 %) (83).

De acordo com a técnica de identificação, cultura ou PCR, a prevalência dessa bactéria nos casos de lesões persistentes assume valores de 56 % ou 77 %, respectivamente (78, 84). A avaliação da sensibilidade dos métodos de cultura e do qPCR, evidenciaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os métodos de detecção. O *E. faecalis* foi identificado em 14 % e 71 % das lesões persistentes avaliadas por cultura e qPCR, respectivamente (79). A frequência do microrganismo em casos indicados para retratamento na Coreia do Norte foi de 64 % dos 14 casos avaliados, enquanto no Brasil a presença dessa bactéria foi constatada em 77 % dos 22 casos de lesões persistentes (78, 85). Em outra amostra da população brasileira, a frequência identificada nos casos de infecção primária foi de 4% (cultura) e 82% (PCR); e 42 % (cultura) e 76% (PCR) nos casos de infecção secundária (86).

Embora esse microrganismo assuma menor prevalência nos casos de lesões primárias, a sua permanência após os procedimentos químicos-cirúrgicos da terapêutica endodôntica representa um risco a possibilidade do bom êxito do tratamento. De acordo com a avaliação dos casos de infecções primárias por técnicas de cultura a prevalência do *E. faecalis* assumiu valores discretos (0,5–7 %), enquanto as técnicas moleculares sinalizaram maior prevalência; 14 % por PCR, 7,5 % por *checkerboard DNA-DNA hybridization* (73, 74, 79, 87).

Apesar da maior frequência do *E. faecalis* nos casos de lesões persistentes, a presença desse microrganismo parece não estar relacionada ao surgimento de lesões apicais, pois não foi constatada diferença significativa na ocorrência da bactéria em canais tratados com e sem lesão periapical. Entre os 27 casos de canais tratados sem lesão periapical o *E. faecalis* foi encontrado em 81,5 %, por PCR, e 18,5 % dos casos, por cultura. Nos casos de canais radiculares tratados endodonticamente com lesão periapical, radiograficamente discernível, a ocorrência do microrganismo foi constatada pela técnica de PCR em 78 % e por cultura em 13% do total de 23 casos avaliados (88).

A avaliação molecular das amostras coletadas de 80 pacientes portadores de diferentes

patologias endodônticas demonstrou significativa associação do *E. faecalis* aos casos assintomáticos do que aos casos sintomáticos. Nos casos de lesão primária (n = 50) a bactéria foi encontrada em 33 % dos casos com lesão periapical crônica e assintomática, em 10 % dos casos de periodontite apical aguda, e em 5 % dos casos de abscessos periapicais agudos. Neste estudo, entre os 80 casos avaliados, a prevalência do microrganismo nos casos de lesões persistentes foi estatisticamente maior àquela apurada nos casos de lesões primárias (89).

Embora o *E. faecalis* possua fatores de virulência, sua relação com as patologias periapicais fundamenta-se na elevada resistência às condutas e substâncias antimicrobianas empregadas durante o tratamento endodôntico, que favorecem a viabilidade do patógeno no canal radicular e nos túbulos dentinários.

2.4.2 Considerações sobre os métodos de redução da microbiota endodôntica

A redução do conteúdo microbiano do sistema de canais radiculares é realizada no tempo operatório denominado preparo do canal. Nesse o uso de instrumentos próprios da Endodontia são subsidiados por produtos químicos específicos, que permitem a lavagem e desinfecção do sistema. Bastante usual é o emprego de soluções de hipoclorito de sódio (NaOCl) por reconhecidamente contribuir para neutralização e remoção do conteúdo necrótico e infectado do canal radicular. No entanto, a redução dos microrganismos nos casos de infecção endodôntica não está relacionada apenas aos efeitos mecânicos e químicos promovidos pelo uso de soluções irrigadoras, mas ao seu contato direto com a microbiota patogênica. A inacessibilidade dos instrumentos e mesmo das substâncias químicas auxiliares às regiões mais íntimas do sistema de canais radiculares (profundidade dos túbulos,

penetração em canais laterais e secundários e no delta apical) favorecem a sobrevivência dos microrganismos nessas regiões, aumentando o risco de recolonização microbiana e insucesso do tratamento (90). Ressalta-se ainda que a concentração da solução NaOCl e o tempo de contato com o conteúdo necrótico estão diretamente relacionados com o binômio toxicidade e eficiência antimicrobiana (91).

Não existe uma concordância a respeito da concentração ideal da solução de NaOCl, que varia de 0,5 % a 6,0 %. Estudos clínicos e laboratoriais demonstraram não haver diferença significativa do efeito bactericida dessa solução nas várias concentrações (0,5; 1,0; 2,5; 5,25 %) no canal radicular (90, 91). Embora as soluções de NaOCl, nas concentrações 6% e 1 %, terem se mostrado mais eficientes que outros agentes antimicrobianos (clorexidina 2 %, Smear Clear™, BioPure™ MTAD™) na eliminação do biofilme de *E. faecalis*, não foi constatada diferença significativa entre as concentrações da solução de NaOCl citadas (92). Siqueira *et al* alertaram sobre o rápido decréscimo do efeito bactericida das soluções NaOCl em baixa concentração, sugerindo a irrigação dessas soluções em maiores volumes e frequência, de forma que as renove compensando a baixa concentração (90).

Contudo, o uso de soluções de NaOCl a 0,5 %, 2,5 % e 5 % demonstrou diferença significativa quando o porcentual de redução bacteriana foi avaliado em amostras de dentina infectada por *E. faecalis*, sendo a concentração de 0,5 % a menos efetiva (91).

O uso de medicação intracanal entre sessões, em especial o hidróxido de cálcio, reforça a intenção de redução da população microbiana intracanal. As propriedades físico-químicas do hidróxido de cálcio estão associadas à difusão dos íons hidroxila em concentração adequada, além da sua permanência por um período sugerido de quatro semanas (93).

Não obstante os benefícios dessa substância à Endodontia seu efeito bactericida é limitado, pois algumas espécies bacterianas, como *E. faecalis*, e fungos, também encontrados

em infecções endodônticas secundárias, sobrevivem em meio alcalino (94). A permanência do hidróxido de cálcio como medicação intracanal por sete dias não foi eficaz na eliminação de microrganismos do gênero *Candida*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (95). A avaliação microbiológica por *checkerboard DNA-DNA hybridization* confirma a limitação da atividade microbiana do hidróxido de cálcio como medicação entre sessões, pela modesta redução da prevalência de *E. nodatum*, *F. periodonticum*, *S. intermedius*, *T. forsythensis* e *T. denticola* no final do tratamento (96).

O efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio e do gluconato de clorexidina a 0,12 % foi avaliado em canais preparados em dentina bovina e infectados por *E. faecalis*. Os resultados demonstraram que a solução de hidróxido de cálcio em água (10 %) foi a mais efetiva, reduzindo as unidades formadoras de colônias daquele microrganismo, quando comparada à solução de hidróxido de cálcio (10 %) associada ao Peridrex (0,12 % gluconato de clorexidina). Entretanto, o hidróxido de cálcio em água (10 %) não promoveu a erradicação do *E. faecalis*, cujo porcentual de redução variou de 89 a 94 % (97).

A suscetibilidade do *E. faecalis* aos agentes antimicrobianos (solução saturada de hidróxido de cálcio, digluconato de clorexidina a 0,05 % ou solução de hipoclorito de sódio a 0,0001 %) dependerá da fase da curva de crescimento do microrganismo. A suscetibilidade das cepas de *E. faecalis* VP3-80 e A197A aos agentes foi maior na fase logarítmica, quando a morte bacteriana ocorreu no período de 3 a 10 minutos após o contato com as substâncias. Já na fase estacionária a morte completa das bactérias levou até 10 minutos. Entretanto, na fase estacionária, a mais resistente, não foi observada morte completa das bactérias mesmo após um período de 10 minutos (98).

A eficiência das substâncias antimicrobianas em condições laboratoriais é diferente quando avaliadas *in vivo*. Nos casos de infecção endodôntica com presença de lesão radiográfica a formação de biofilmes, comunidades de microrganismos aderidas à superfície

apical e embebidas em matriz de polissacarídeos extracelular clinicamente interfere no sucesso do tratamento, devido à inerente resistência aos agentes antimicrobianos e à inacessibilidade direta ao preparo químico-cirúrgico (99, 100).

Mediante o êxito parcial das condutas antimicrobianas, acima citadas, a irradiação laser é proposta como uma terapêutica a ser associada ao tratamento endodôntico na otimização da redução da população microbiana nos casos de infecção. Estudos demonstraram resultados promissores da ação fototérmica da irradiação dos lasers em alta intensidade na redução microbiana em Endodontia (6,7,8,9,10).

As investigações laboratoriais e clínicas das propriedades antimicrobianas dos lasers de diodo e Nd:YAG assumem destaque dentre os comprimentos de onda com aplicações endodônticas. Apesar do consagrado efeito bactericida do laser de Nd:YAG em Endodontia, o laser de diodo demonstra ascedência dada a sua eficiência com uma melhor relação custo/benefício.

O efeito bactericida do laser Nd:YAG contra *E. faecalis*, quando inoculado em canais radiculares, demonstrou uma redução de 99,91 %, correspondendo à redução logarítmica de 3,07. O valor logarítmico máximo e mínimo de redução foi da ordem de 5,46 e 1,54, respectivamente (101).

A irradiação do laser de diodo (810 nm) em canais radiculares infectados por *E. coli* e *E. faecalis* demonstrou potente efeito bactericida. Apenas cinco, entre as 44 amostras infectadas, exibiram crescimento bacteriano positivo após a irradiação. O parâmetro de irradiação mais efetivo na redução microbiana tinha potência em 4 W e taxa de repetição de 0,01 e 0,02 segundos (7).

O efeito bactericida dos lasers de diodo (810 nm/ 2 W/ 50 Hz/ 400 µm) e Nd:YAG (1,5 W/ 15 Hz/ 200 µm) também foram testados *in vivo* em relação a dentes com presença de periodontite apical radiograficamente discernível. Os autores alcançaram a eliminação quase

completa do conteúdo microbiano após a segunda irradiação do canal radicular. O laser de diodo promoveu um fator máximo de redução logarítmica de 4,22 para o gênero estreptococos e 3,33 para o gênero estafilococo. Enquanto para o laser de Nd:YAG os fatores máximos de redução alcançaram 3,9 e 4,32, para os respectivos gêneros. O uso de soluções bactericidas nos pacientes dos grupos controle permitiu a discreta redução microbiana de apenas um fator logarítmico (8, 102).

O efeito bactericida do laser de diodo no modo de emissão contínuo (810 nm/ 0,6 W/ 400 μ m) decresce com o aumento da espessura dentinária. Foi observado decréscimo do índice de redução logarítmica de 1,78 para 0,73 quando a espessura das fatias de dentina infectadas por *E. faecalis* foi aumentada de 100 μ m para 500 μ m, respectivamente (103). O efeito bactericida do laser de diodo com comprimento de onda em 980 nm mostrou-se menos efetivo na redução bacteriana de fatias de dentina contaminadas por *E. faecalis*. A avaliação do porcentual de redução do microrganismo revelou que espessuras maiores das fatias de dentina bovina exigiram potências de irradiação elevadas; a maior média de redução bacteriana (32%) nas fatias com espessura de 500 μ m só foi alcançada com potência de 2,8 W (104).

A avaliação comparativa da ação bactericida entre diferentes comprimentos de onda em fatias de dentina com 1 mm de espessura demonstrou que o laser de diodo (810 nm/ 1,5 W/ 15 Hz/ 160 mJ) eliminou a viabilidade da *E. coli* em 16 das 20 amostras contaminadas por esse microrganismo, enquanto o laser Nd:YAG (1,5 W/ 15 Hz/ 140mJ) assim o fez em apenas 8 amostras. Contudo, foi constatada certa dificuldade de os referidos lasers promoverem a completa erradicação do *E. faecalis*. O laser de diodo (810 nm/ 1 W/ 15 Hz/ 120 mJ) foi capaz de eliminar esse microrganismo em apenas uma escala logarítmica, já o laser Nd:YAG promoveu uma redução de duas escalas logarítmicas (105).

Os efeitos bactericidas do laser de diodo em canais radiculares contaminados por *S.*

sanguinis foram comparados à técnica de irrigação de H₂O₂/NaOCl. Os canais radiculares foram irradiados por 60 segundos com o laser de diodo (809 nm) operando sob o regime contínuo de emissão e com potências distintas de irradiação (1,5; 3,0; 4,5 W). A potência de 1,5 W não mostrou efetividade na eliminação do conteúdo microbiano do canal radicular. O percentual de redução bacteriano do laser com potência de 3 W foi comparável à irrigação de H₂O₂/NaOCl. A irradiação do laser com potência de 4,5 W ou a associação da irrigação H₂O₂/NaOCl com a irradiação do canal (3 W) alcançaram o maior percentual de morte bacteriana (99,96%) (31).

A associação do laser de diodo (830 nm) com a medicação de hidróxido de cálcio e PMCC reduziu em 100 % a população microbiana de *E. faecalis* inoculada em canais radiculares. O uso do laser sem a associação da medicação permitiu redução de 96,5 % e 57,6 % para parâmetros de 3W e 2,5 W, respectivamente (106).

O percentual de redução de unidades formadoras de colônias em amostras de dentina humana com 500 µm de espessura foi diretamente proporcional ao aumento da potência de irradiação (0,5; 1,0; 3,0; 5,0 e 7,0 W). Não foram constatadas diferenças estatísticas na eliminação do *S. mutans* entre os grupos irradiados pelo laser de diodo (810 nm) com potência 0,5 e 1,0 W (CW/ 400 µm), assim como entre os grupos 5,0 e 7,0 W. Os valores mínimo (19,4 %) e máximo (97,7 %) de redução microbiana em fatias com 500 µm de espessura foram relacionados aos grupos irradiados com potências de 0,5 e 7,0 W, respectivamente. A irradiação de amostras com 1 e 2 mm de espessura pelo laser de diodo com 7 W de potência reduziu o percentual de morte bacteriana para 50,9 % e 20,1 % (35).

Tendo em vista o relato na Revisão da Literatura pretendemos com este trabalho avaliar os efeitos físicos e biológicos derivados da irradiação do laser de diodo em associação à terapia endodôntica.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos físicos e biológicos do uso do laser de diodo associado à terapêutica endodôntica tradicional, tendo em vista:

- 3.1 avaliar *in vitro* o aumento de temperatura na superfície radicular externa durante a irradiação do canal radicular com laser de diodo nos regimes de emissão contínuo e pulsado;
- 3.2 avaliar *in vitro* as alterações morfológicas ocorridas na dentina do canal radicular após a irradiação pelo laser de diodo;
- 3.3 avaliar *in vitro* o grau de infiltração marginal apical, após obturação do canal radicular, nas amostras irradiadas e não irradiadas;
- 3.4 avaliar *in vivo* o potencial de redução microbiana da terapêutica tradicional (grupo controle) e da sua associação com a irradiação laser (grupo laser).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – Protocolo 159/04 (Anexo A).

4.1 Avaliação do aumento da temperatura na superfície radicular externa durante a irradiação do canal radicular

4.1.1 Preparação das amostras

Foram cedidos pelo Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia da USP 195 dentes permanentes unirradiculares. Após a remoção dos debrís orgânicos, todos os espécimes foram radiografados nos sentidos mésiodistal e vestibulolingual para verificação de variações anatômicas do canal radicular. Após a aplicação dos critérios de exclusão, tais como presença de cárie na porção radicular e/ou complexidade anatômica do canal radicular, foram utilizados neste estudo um total de 120 dentes.

Os espécimes foram seccionados transversalmente no limite amelocementário com

auxílio de um disco diamantado duplo (Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) acoplado em um micrótomo de tecido duro.

O canal radicular foi explorado em toda extensão com uma lima tipo K nº 10 (Maillefer Instruments, Ballaigues, Suíça) até a visualização da ponta do instrumento no forame apical, para determinação do comprimento real da raiz. O comprimento real de trabalho (CRT) foi estabelecido 1 mm aquém do comprimento real da raiz.

O preparo químico-cirúrgico foi inicializado pelo uso de brocas Gates–Glidden nºs 3 e 4 (Mani Inc., Utsunomiya, Tochigi, Japão) no terço cervical. Seguiu-se o uso seqüencial de limas tipo K até nº 40, com auxílio do creme Endo–PTC (Fórmula & Ação, São Paulo, São Paulo, Brasil) associado com solução de NaOCl 0,5 % (Fórmula & Ação, São Paulo, São Paulo, Brasil). O preparo apical de todas as amostras foi realizado com lima tipo K nº 45. Após o uso de cada instrumento foi irrigado um volume de 3 ml de NaOCl 0,5 %. Ao final do preparo, o canal foi irrigado com 10 ml de EDTA–T 17 %, seguido da solução de NaOCl 0,5 % em igual volume.

As 120 amostras foram mantidas em ambiente úmido a 37 °C até o momento de sua utilização.

4.1.2 Irradiação das amostras

Foi utilizado um laser de diodo de GaAlAs (ZAP Softlaser, Pleasant Hill, Iowa, EUA) com comprimento de onda em 810 nm (\pm 5 nm) e regime de emissão no modo contínuo (CW) ou pulsado (50 ms ativado/50 ms inativado). A potência emitida na saída da fibra (\varnothing = 400 μ m) foi medida por um medidor de potência/energia (Fieldmaster, Coherent Inc. Santa Clara,

Califórnia, EUA) antes e depois da irradiação de cada amostra.

Vinte incisivos inferiores foram utilizados na avaliação do aumento de temperatura na superfície externa radicular durante a irradiação intracanal com o laser de diodo. A escolha de incisivos inferiores permitiu avaliar o aumento de temperatura em condições críticas, dada a menor espessura dentinária deste grupo dentário. As amostras foram aleatoriamente divididas em dois grupos: grupo contínuo (Grupo CW) e grupo pulsado (Grupo PL). Os parâmetros de irradiação definidos a cada um dos grupos foram:

- Grupo CW – amostras irradiadas com laser de diodo no regime contínuo de emissão; $P = 2,5 \text{ W}$; $\varnothing = 400 \text{ }\mu\text{m}$; $I = 1.989 \text{ W/cm}^2$ (na saída da fibra);
- Grupo PL – amostras irradiadas com laser de diodo no regime pulsado de emissão; $\bar{P} = 1,25 \text{ W}$; 10 Hz ; $\varnothing = 400 \text{ }\mu\text{m}$; $I = 994 \text{ W/cm}^2$ (na saída da fibra); 50 ms ativado/ 50 ms desativado.

A fibra foi inserida no interior do canal na extensão do CRT e movimentada no sentido ápice–coroa em movimentos helicoidais (2 mm/s) (101). O canal foi irradiado por 5 ciclos, com intervalos de resfriamento de 20 segundos entre os ciclos de irradiação. Todas as amostras foram irradiadas em condição de ausência de umidade no canal radicular.

4.1.3 Variação de temperatura (ΔT) medida pela câmera termográfica

As medições da variação de temperatura (ΔT) na superfície externa radicular foram realizadas em ambiente com a temperatura mantida em $21 \text{ }^\circ\text{C}$ por duas horas antes do início do experimento e a umidade relativa medida em 72% .

As variações de temperatura foram registradas por uma câmera termográfica (SC

3000, Boston, Massachusetts, EUA), com fotodetector infravermelho cuja sensibilidade é de 0,03 °C e o tempo de resposta de até 500 μ s (FPA–QWIP – *Focal plane array-quantum well infrared photodetector*). O sistema termográfico foi ajustado considerando a emissividade da dentina como 0,91, para o intervalo de temperatura de 20 – 100 °C, e com frequência de aquisição de imagens térmicas de 60 Hz.

O valor limite do aumento de temperatura considerado seguro, resultante da irradiação laser do canal radicular, foi 10 °C (23).

As amostras foram individualmente fixadas em um dispositivo e posicionadas a uma distância de 10 cm da lente da câmera termográfica, correspondente à distância focal da lente.

As imagens apuradas pela câmera termográfica foram processadas pelo programa do sistema da câmera (ThermaCam Research 2001, Boston, Massachusetts, EUA) para calcular na região de interesse o aumento de temperatura em cada amostra. O perímetro da imagem de cada amostra foi delimitado e três pontos foram selecionados ao longo da imagem. O primeiro ponto foi selecionado na região apical, 1 mm aquém da imagem do ápice; o segundo ponto, na metade do comprimento da amostra e o terceiro ponto, a 1 mm do limite cervical da imagem. O sistema determinou em cada um dos pontos selecionados as temperaturas atingidas durante todo o tempo de irradiação, assim como a máxima temperatura atingida pela amostra, independentemente da posição.

A variação máxima de temperatura (ΔT) foi calculada para cada amostra pela diferença entre os valores máximo e mínimo em cada um dos ciclos de irradiação utilizando o programa Origin 7.0 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, EUA). O intervalo de confiança das medianas dos valores de ΔT para cada uma das diferentes regiões de análise foi avaliado pelo método de Wilcoxon, com nível de significância de 95 %.

4.2 Avaliação das alterações morfológicas nas paredes do canal radicular

4.2.1 Divisão dos grupos

A alteração morfológica na dentina do canal radicular foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em dez amostras controle e em vinte amostras irradiadas pelo laser de diodo. As amostras irradiadas avaliadas pela MEV foram as mesmas amostras utilizadas no experimento de variação de temperatura. Os grupos avaliados para análise de alteração morfológica foram assim divididos:

- Grupo controle (n = 10): amostras não irradiadas;
- Grupo CW – amostras irradiadas com laser de diodo no regime contínuo de emissão; P = 2,5 W; Ø = 400 µm; I = 1.989 W/cm² (na saída da fibra);
- Grupo PL – amostras irradiadas com laser de diodo no regime pulsado de emissão; \bar{P} = 1,25 W; 10 Hz; Ø = 400 µm; I = 994 W/cm² (na saída da fibra); 50 ms ativado/50 ms desativado.

4.2.2 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram clivadas no sentido vestibulo-lingual e submetidas a um banho de ultra-som por 5 minutos em água destilada. Posteriormente, as amostras foram imersas em

solução de glutaraldeído a 2,5 % por período mínimo de 2 horas. Seguiu-se desidratação das amostras pela imersão sucessiva em soluções alcoólicas com concentrações graduais (30, 50, 70, 90 e 96 %), por dois tempos de 5 minutos em cada concentração, e a imersão final em álcool absoluto por dois tempos de 10 minutos. Após a desidratação as amostras foram recobertas por solução de HMDS (Electron Microscopy Sciences, Washington, Pennsylvania, EUA) e mantidas na capela de fluxo até a evaporação total da solução e secagem completa das amostras.

Cumprido o protocolo de desidratação, as amostras foram preparadas para MEV. As alterações morfológicas nas paredes do canal radicular foram avaliadas no terço apical, a 2 mm do ápice, e no terço médio, correspondente à metade da extensão da raiz, por microscópio eletrônico de varredura (Phillips LX-30, Eindhoven, Holanda).

Nas regiões definidas foi observada a condição da entrada dos túbulos dentinários. As características morfológicas das amostras irradiadas foram sempre comparadas ao padrão morfológico observado nas amostras do grupo controle.

4.3 Avaliação da infiltração marginal apical

4.3.1 Divisão dos grupos

Noventa amostras foram preparadas como descrito no item 4.1.1 e aleatoriamente divididas em dois grupos mediante o tratamento das paredes dentinárias:

- Grupo controle (n = 45) – as paredes do canal radicular não foram irradiadas. As

paredes dentinárias foram irrigadas com solução de EDTA-T a 17 % para promover a remoção de *smear layer*.

- Grupo laser (n = 45) – as paredes do canal radicular foram irradiadas pelo laser de diodo (ZAP Softlaser, Pleasant Hill, Califórnia, EUA) no regime contínuo de emissão ($P = 2,5 \text{ W} / \text{Ø} = 400 \text{ µm} / I = 1.989 \text{ W/cm}^2$, na saída da fibra), de acordo com a descrição do item 4.1.2, após as paredes dentinárias serem previamente tratadas com solução de EDTA-T a 17 %.

As amostras de cada grupo foram divididas em três subgrupos de acordo com o cimento endodôntico usados na obturação do canal radicular, conforme a Figura 4.1. Foram utilizados três cimentos endodônticos: N-Ricket (Fórmula & Ação, São Paulo, São Paulo, Brasil), AH Plus™ (Dentsply, Alemanha) e Apexit® (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein, Alemanha).

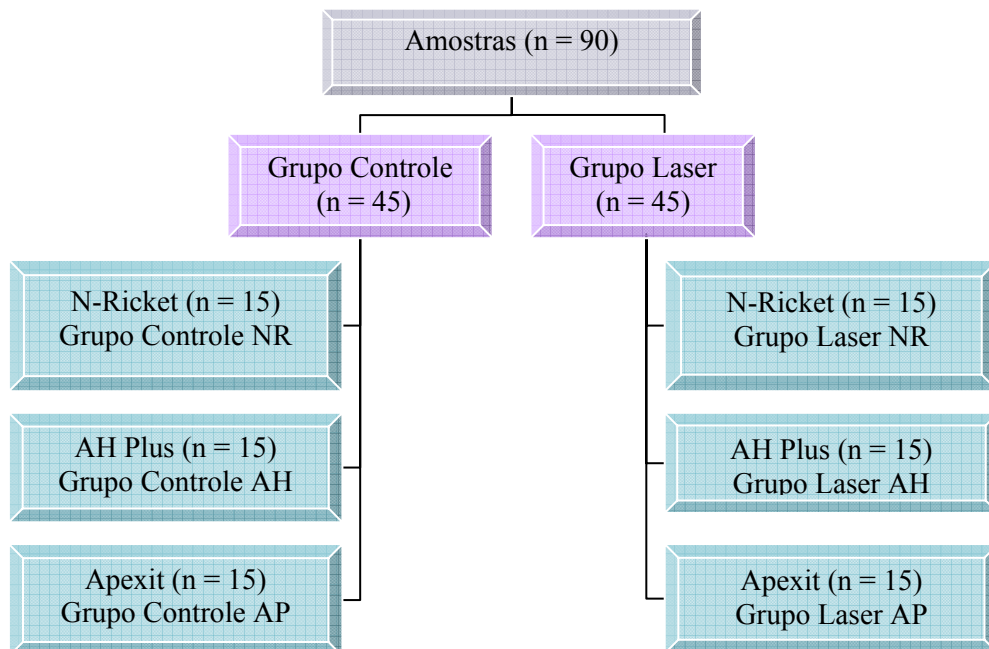


Figura 4.1 – Distribuição dos grupos experimentais na avaliação da infiltração marginal apical

4.3.2 Obturação dos canais radiculares

Concluído o tratamento das superfícies dentinárias, o canal radicular foi secado com pontas de papel absorvente. A seleção dos cones de guta-percha foi realizada a partir do diâmetro de 45, de forma que o cone selecionado estivesse perfeitamente ajustado ao limite apical do preparo.

A impermeabilização das paredes externas da superfície radicular foi promovida pela dupla aplicação de cianoacrilato de etila, exceto nas proximidades da entrada do forame apical. Para evitar o indesejável escoamento do cianoacrilato de etila pela entrada do forame, uma lima nº 15 foi introduzida no interior do canal até o seu ajuste natural à abertura foraminal. Após a secagem da segunda demão do cianoacrilato de etila, a lima foi removida e a obturação do canal realizada.

A manipulação do cimento endodôntico foi realizada de acordo com as instruções dos fabricantes. A inserção do cimento no interior do canal foi realizada com o auxílio de cone principal selecionado (Endo Points, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). Foram utilizados espaçadores digitais para condensação lateral dos cones de guta-percha e cimento obturador.

A qualidade da obturação foi avaliada radiograficamente nos sentidos mésio-distal e vestibulo-lingual. O excesso cervical do material obturador foi removido com instrumento aquecido a 2 mm do limite cervical do canal. A massa obturadora foi condensada verticalmente com calcadores do tipo Paiva e a cavidade cervical selada com material restaurador provisório (IRM, Dentsply, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil), subseqüentemente impermeabilizado com cianoacrilato de etila.

4.3.3 Avaliação da infiltração marginal apical

Concluída a obturação e a impermeabilização, as amostras foram imediatamente imersas em solução azul de metileno 0,5 %, pH 7,2 a 37° C por 72 horas.

Após a remoção, as amostras foram lavadas em água corrente por 5 min e levadas à estufa a 37 °C por 24 horas para remoção da umidade. As amostras foram então clivadas no sentido vestibulo-lingual e o material obturador gentilmente destacado da extensão do canal radicular com auxílio de uma sonda exploradora. O processo de clivagem comprometeu a integridade da porção apical de algumas amostras, inviabilizando a análise da infiltração marginal apical do corante.

Todas as amostras foram fotografadas por uma câmera digital, padronizando as condições de iluminação e distância entre a câmera e a amostra. As imagens captadas foram digitalizadas para a posterior avaliação da infiltração linear do corante pelo programa de análise de imagens (*Image J – Java image processing program* – disponível gratuitamente na *Web*).

A escala de mensuração do programa foi calibrada para cada amostra. Inicialmente foi mensurado em *pixels* o comprimento da raiz (da porção apical à porção cervical) na imagem digitalizada exibida pelo programa. Em seguida, a proporção entre aquele valor e o comprimento real da raiz, mensurado com um paquímetro digital, foi determinada estabelecendo a escala de mensuração da amostra. Assim, a mensuração da infiltração linear do corante, a partir do batente apical, foi determinada com relação à escala de mensuração determinada previamente a cada uma das amostras (Figura 4.2).

Os valores da infiltração linear do corante nos grupos experimentais foram avaliados

pelo teste estatístico não paramétrico de *Kruskal-Wallis* (Programa BioEstat 4.0, Belém, Pará, Brasil).

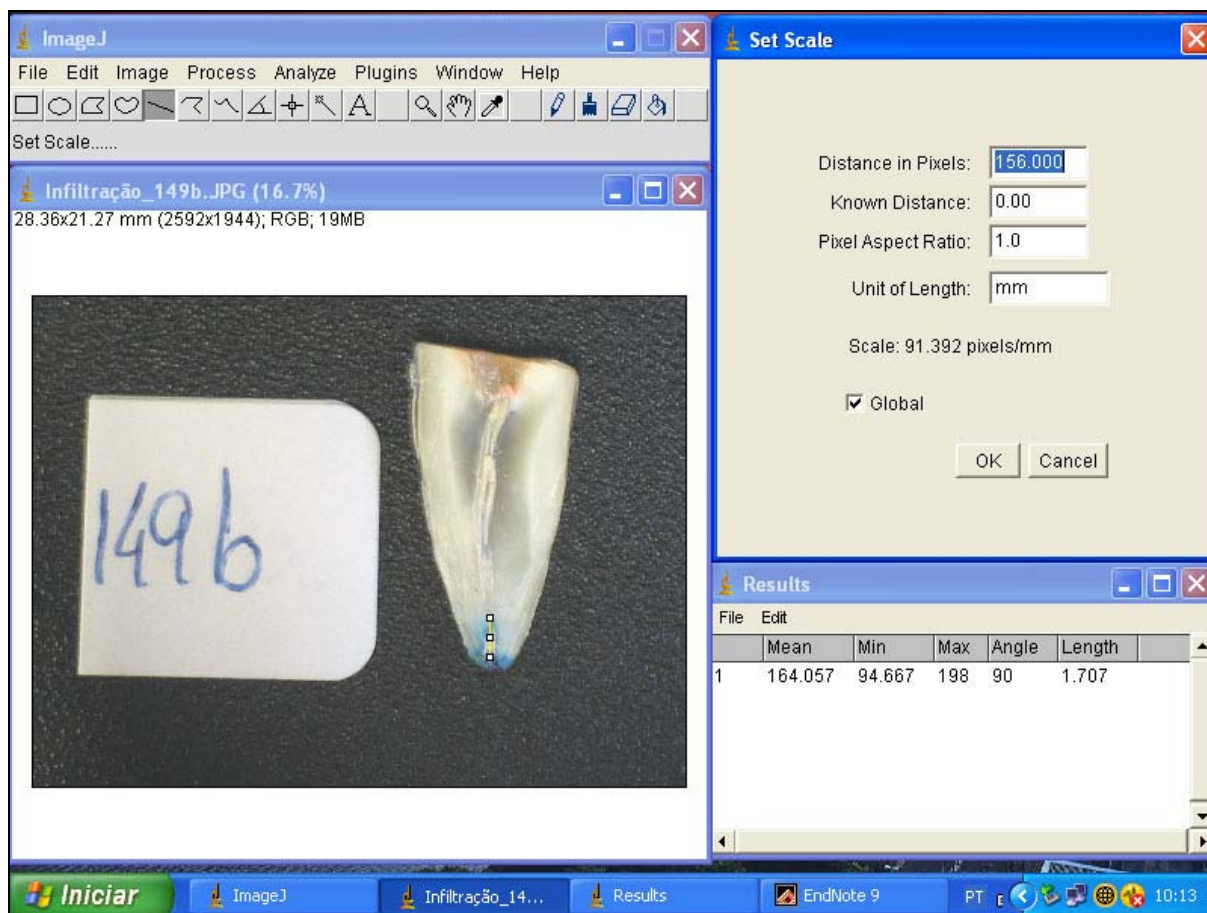


Figura 4.2 – Ilustração do procedimento de mensuração da infiltração linear do corante pelo programa ImageJ

4.4 Avaliação microbiológica

4.4.1 Seleção dos pacientes

Foram selecionados vinte e três pacientes, com necessidade de tratamento endodôntico, junto à Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da USP, São Paulo. Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo, assim como seus riscos e benefícios. Aqueles que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando o tratamento (Anexo B).

Os pacientes participantes, com idade entre 18 e 60 anos, de acordo com os critérios de inclusão apresentaram quadro clínico assintomático de infecção endodôntica com evidência clínica de ausência de vitalidade pulpar em dentes unirradiculares, com ou sem presença de lesão periapical radiográfica discernível.

A história clínica do paciente foi avaliada pelo preenchimento de um questionário de saúde/anamnese. O dente indicado para tratamento endodôntico foi avaliado clinicamente quanto ao comportamento à palpação apical, à percussão vertical e horizontal, e aos testes térmicos, e radiograficamente, quanto à presença ou ausência de lesão periapical.

Foram excluídos do estudo os pacientes que relataram uso de antibióticos no período dos últimos três meses, e aqueles que apresentaram sinais clínicos de periodontite.

Os pacientes foram divididos aleatoriamente em dois grupos de acordo com a terapêutica antimicrobiana instituída: grupo controle e grupo laser. A terapêutica antimicrobiana aplicada a ambos os grupos compreendeu irrigação do canal com solução NaOCl 0,5 % e uso de hidróxido de cálcio como medicação entre sessões; no grupo laser foi realizada a associação da irradiação do laser de diodo à terapêutica tradicional empregada no grupo controle (Figura 4.3).

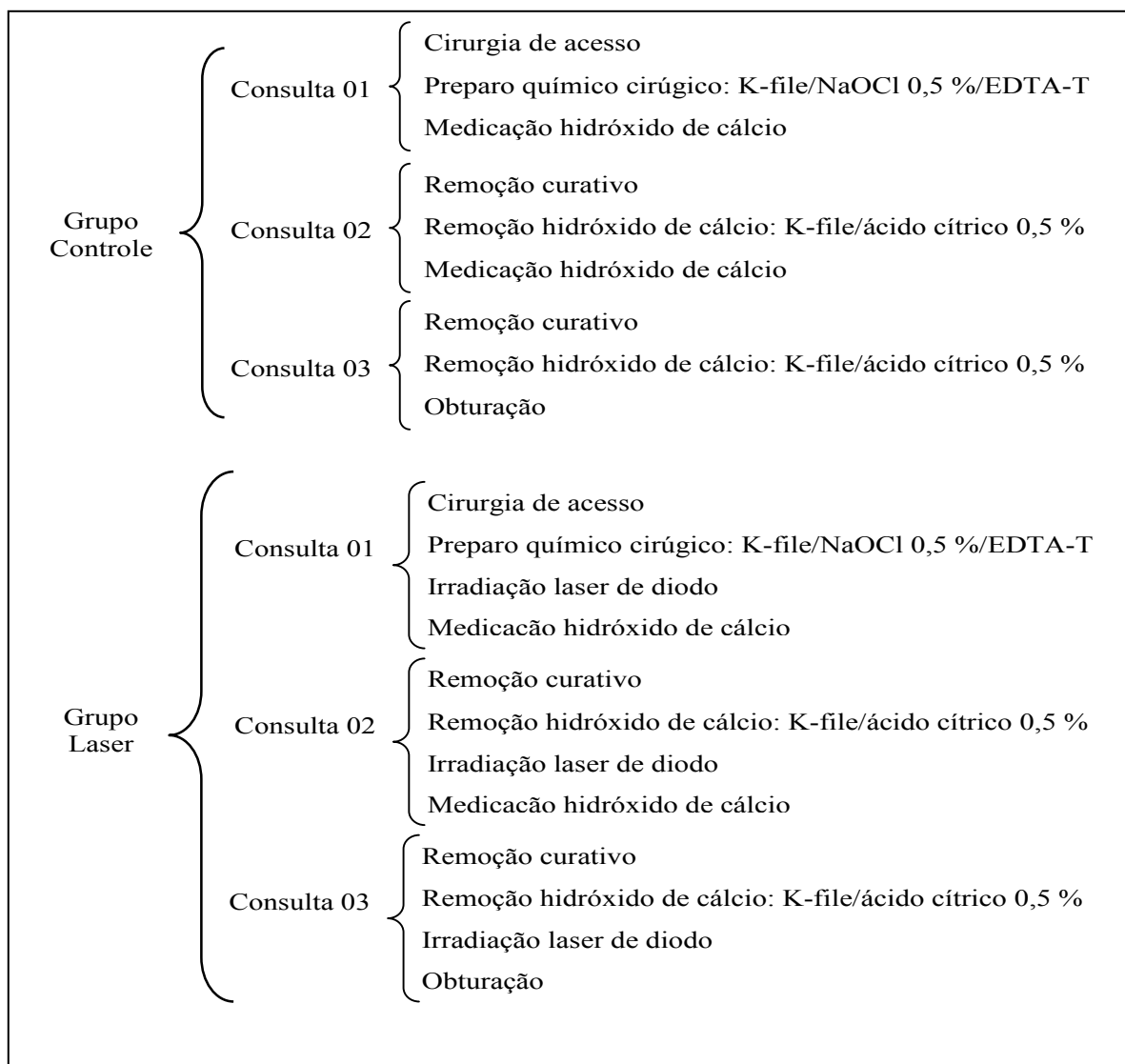


Figura 4.3 – Representação esquemática das terapêuticas antimicrobianas empregadas nos grupos controle e laser

4.4.2 Procedimentos operatórios

A superfície coronária recebeu profilaxia com pedra-pomes e água para remoção de qualquer induto orgânico, seguindo-se o isolamento absoluto do campo operatório. A limpeza do campo operatório foi realizada com peróxido de hidrogênio a 30% e a sua descontaminação com solução de hipoclorito de sódio a 2,5 %, por 30 segundos, e em

seguida, a inativação desta solução com tiosulfato de sódio a 5 % (73).

A cirurgia de acesso foi realizada com broca esférica estéril sob refrigeração, e o campo operatório novamente limpo e descontaminado. A abertura coronária também recebeu o mesmo procedimento de limpeza e descontaminação, pela irrigação com 3 ml de cada uma das soluções citadas, acrescentando-se irrigação final de 3 ml de solução salina esterilizada (NaCl 0,85 %).

A radiografia de diagnóstico foi utilizada para determinação do comprimento aparente do dente. O comprimento real de trabalho (CRT) foi determinado 1 mm aquém do comprimento aparente do dente. O CRT foi confirmado radiograficamente após a inserção de uma lima tipo K nº15 no comprimento real de trabalho. A entrada do canal radicular foi preparada com brocas Gates–Glidden nº3 e nº4, e o canal preparado manualmente, ao longo do CRT, pelo uso seqüencial de limas tipo K nº 15 ao nº 40. O preparo do batente apical foi realizado com lima tipo K nº 45. O preparo químico-cirúrgico foi realizado com auxílio do creme Endo–PTC associado com solução de NaOCl 0,5 % (Fórmula & Ação, São Paulo, São Paulo, Brasil). Após o uso de cada instrumento, o canal foi irrigado com 3 ml de solução de NaOCl 0,5 %. Ao final do preparo químico-cirúrgico o canal foi irrigado com 10 ml de solução de EDTA–T 17 % (Fórmula & Ação, São Paulo, São Paulo, Brasil) e com solução de NaOCl 0,5 % em igual volume. A remoção do NaOCl 0,5 % foi realizada pela irrigação de 10 ml de solução de salina estéril.

A pasta de hidróxido de cálcio preparada em veículo aquoso (solução salina esterilizada) foi utilizada como medicação intracanal. O preenchimento do canal radicular pela pasta foi realizado em toda a extensão do comprimento de trabalho com auxílio de propulsor do tipo lentulo. O tempo de permanência da medicação entre as sessões foi de sete dias. Nas segunda e terceira sessões foi realizada a remoção da medicação intracanal pela irrigação da solução de ácido cítrico a 0,5 % (Fórmula & Ação, São Paulo, São Paulo, Brasil),

num volume de 10 ml. Em seguida, irrigação com 10 ml de solução salina esterilizada (NaCl 0,85 %) foi realizada antes da coleta microbiológica para remover remanescentes da solução de ácido cítrico.

4.4.3 Uso do laser

A irradiação do canal radicular foi realizada com laser de diodo Opus 10 (OpusDent, Yokneam, Israel) com comprimento de onda em 830 ± 5 nm. Os canais radiculares do grupo laser foram irradiados com laser de diodo sob regime contínuo de emissão e com parâmetros de irradiação em $P = 2,5$ W; $\varnothing = 400$ μm ; $I = 1989$ W/cm².

As fases de irradiação aconteceram nas três sessões do tratamento endodôntico, após o preparo químico-cirúrgico (sessão 01) e após a remoção da medicação intracanal (sessões 02 e 03). Assim, quando concluído o preparo químico-cirúrgico na primeira sessão o canal radicular foi secado com pontas de papel absorvente estéril nº 45, e o canal radicular irradiado conforme descrito a seguir. Nas segunda e terceira sessões, após a remoção dos remanescentes da pasta de hidróxido de cálcio pela ação de lima tipo K nº 25 e por irrigação com solução de ácido cítrico e posteriormente pela solução salina esterilizada (NaCl 0,85 %), o canal radicular foi secado e a irradiação realizada.

A fibra foi inserida no interior do canal na extensão do CRT e movimentada no sentido ápice–coroa em movimentos helicoidais (2 mm/s) (101). O canal foi irradiado por cinco ciclos, com intervalos de resfriamento de 20 segundos entre os ciclos de irradiação. A irradiação do canal radicular foi realizada em condição de ausência de excesso de umidade.

4.4.4 Coleta das amostras microbiológicas

As coletas do conteúdo microbiano do canal radicular foram realizadas em momentos distintos ao longo das três sessões do tratamento endodôntico, conforme descrito na figura 4.4.

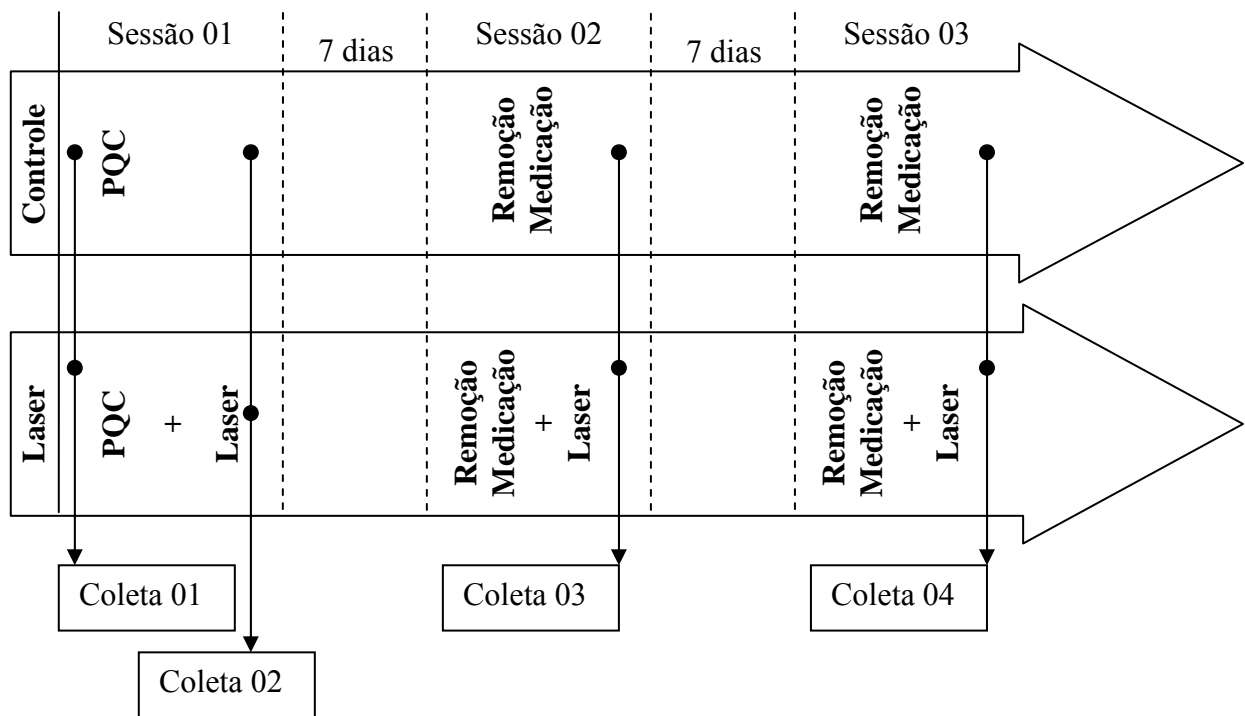


Figura 4.4 – Momentos das coletas das amostras microbiológicas nos grupos controle e laser

Para a coleta das amostras microbianas os canais foram preenchidos com solução salina esterilizada (NaCl 0,85 %). Três cones de papel absorvente esterilizados nº15 foram inseridos no canal, sucessivamente, ao longo do comprimento de trabalho estabelecido

permanecendo por 60 segundos cada um deles. Após a remoção, os cones foram imediatamente e alternadamente transferidos para meio de transporte VMGA III, contendo pérolas de vidro, ou para criotubo contendo 100 µl de solução TE (10 mM Tris Cl – pH 7,4; 7,5 ou 7,8; 1 mM EDTA – pH 8,0), conforme Figura 4.5.

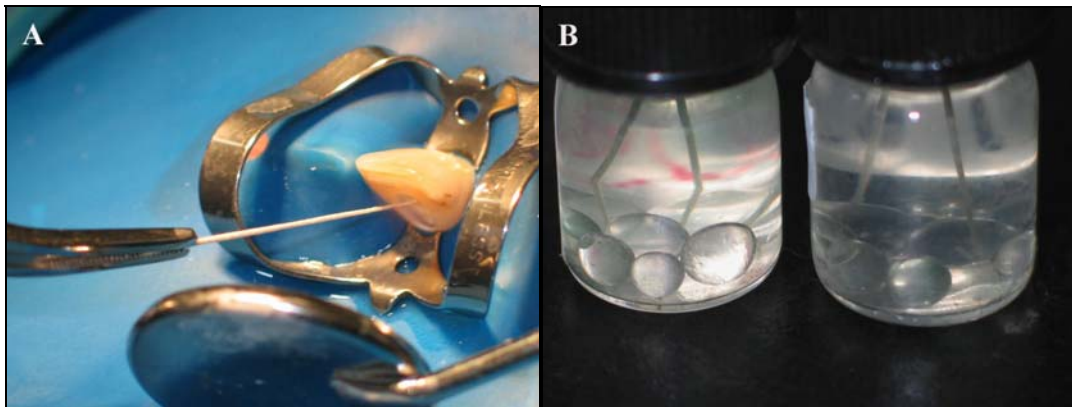


Figura 4.5 – Coleta microbiana intracanal com cone de papel absorvente (A) e acondicionamento dos cones em tubos de VGMA III (B)

Os tubos contendo VGMA III foram encaminhados em temperatura ambiente e manipulados no laboratório de Microbiologia Oral (ICB-USP), num período de até 4 horas após a coleta, para determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de microrganismos viáveis, o número de UFC de *Enterococcus* e de *Lactobacillus* por amostra, e a proporção de *Enterococcus* e de *Lactobacillus* por microrganismos viáveis.

Os tubos contendo TE foram imediatamente congelados em freezer a -20 °C e transportados em banho de gelo seco para o laboratório, para posterior avaliação da presença de microrganismos pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.4.5 Análise da microbiota por cultura

Os tubos contendo as amostras em meio de transporte semi-sólido VGMA III foram incubados por 15 minutos em estufa a 37 °C para liquefação da gelatina. Em seguida, os tubos foram agitados em vortex por 1 minuto e diluídos em água peptonada (pH 7,2). Alíquotas de 100 µL da amostra sem diluição e das diluições seriadas foram semeadas, em duplicata, na superfície de ágar Brucela (BBL™, BD, MD, EUA) acrescidas de 5 % de sangue desfibrinado de carneiro, 50 µL de hemina (5 mg/mL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) e 500 µL de solução de menadione (1 mg/mL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) para cultivo dos anaeróbios viáveis totais, em câmara de anaerobiose (85 % N₂, 5 % CO₂, 10 % H₂) (Plaslab, Lansing, Michigan, EUA) a 37 °C por 8-10 dias. Alíquotas de 100 µL da amostra sem diluição e diluída foram semeadas, também em duplicata, na superfície de ágar M. enterococos (Difco™, MD, EUA), para detecção do gênero *Enterococcus*. As placas de M. enterococos foram incubadas por 48 horas em estufa a 37 °C. Alíquotas de 100 µL da amostra sem diluição e diluída foram misturadas ao ágar Rogosa (Difco™, MD, EUA) fundido e mantido na temperatura de 42 °C. A seguir o ágar foi inserido em placas de Petri e após sua solidificação as mesmas foram incubadas por 48 horas em estufa com atmosfera de 10 % de CO₂ a 37 °C (She Lab, Cornelius, Oregon, EUA) (Figura 4.6).

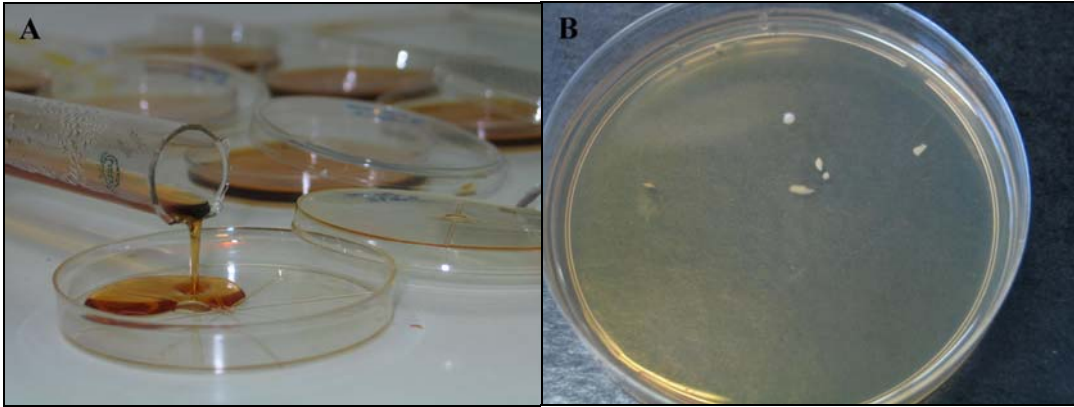


Figura 4.6 – Alíquota semeada em ágar rogosa (A), placa com crescimento de *Lactobacillus* após 48 horas de incubação em estufa CO₂ a 37° C (B)

Após o período de incubação, foram selecionadas as placas contendo entre 30 e 300 colônias. Foi determinado o número de unidades formadoras de colônias de organismos anaeróbios viáveis, de *Enterococcus* e de *Lactobacillus* por amostra, e a proporção de *Enterococcus* e de *Lactobacillus* por microrganismos viáveis.

A comparação entre as médias das UFC de organismos viáveis por amostra no grupo controle e no grupo laser foi avaliada em cada uma das coletas pelo teste de *Mann-Whitney* ($\alpha = 0,05 \%$) (Programa BioEstat 4.0, Belém, Pará, Brasil). O teste de *Wilcoxon* ($\alpha = 0,05 \%$) (Programa BioEstat 4.0, Belém, Pará, Brasil) foi utilizado na comparação das médias UFC de microrganismos viáveis por amostras nas coletas realizadas em cada um dos grupos.

4.4.6 Análise da microbiota por reação de polimerase em cadeia (PCR)

4.4.6.1 extração de DNA

As amostras endodônticas em tampão TE foram descongeladas a 37 °C por 10 minutos e homogeneizadas por agitação durante 1 minuto. As pontas de papel foram removidas, e a suspensão microbiana lavada três vezes com 200 µl de água ultrapura (Milli Q) e centrifugadas durante 2 minutos a 2.500 g (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Após a lavagem final, o precipitado foi resuspenso em 200 µl de água ultrapura. A lise celular foi obtida pela imersão dos tubos em banho-maria em ebulição por 10 minutos, seguindo-se imediatamente o resfriamento em gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 9.000 g a 4 °C para remoção das células não lisadas e restos celulares, e o sobrenadante coletado foi usado como DNA molde para reação de PCR (107).

4.4.6.2 amplificação da região 16SrRNA *E. faecalis* por PCR

O DNA das amostras foi utilizado como molde em reação PCR padrão para amplificação da região 16SrRNA utilizando os iniciadores espécie-específicos para *E. faecalis*. Os oligonucleotídeos utilizados apresentaram as seguintes seqüências: 5' – GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG – 3' (*forward primer*); 5' – CCG TCA GGG GAC

GTT CAG – 3' (*reverse primer*) (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil) (78).

Para cada reação de amplificação da região *16SrRNA* foram utilizados: 5 µl de DNA molde das amostras clínicas, 1 µl de cada *primer*, 40 nmol de cada um dos dNTP, 1U de Platinum Taq polimerase (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil), 2,5 µl de tampão (10X), cloreto de magnésio na concentração final de 3mM e água Milli Q estéril para 25 µl de volume total de reação. O controle positivo constituiu-se da reação padrão acrescida de 1 µl de DNA de *E. faecalis* (ATCC 29212). O controle negativo foi constituído da reação padrão sem adição do DNA molde.

As condições de termociclagem (MJ Research, Minnesota, Minneapolis, EUA) seguidas foram: desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, seguindo-se 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 60 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1,5 minuto, com 15 segundos adicionais para cada ciclo, e um ciclo de extensão final de 72 °C por 15 minutos (80).

Os produtos da reação de PCR foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 1 %, em tampão Tris Acetato EDTA (TAE). (Tris acetato 40 mM, pH 8,5; EDTA 2 mM) e corados com brometo de etídio sendo fotografados sob luz ultravioleta (EPSON, Hemel Hempstead, Hertforshise, Inglaterra). As reações que apresentaram banda única com tamanho esperado (310 bp) foram consideradas positivas para a espécie.

Foi avaliada a relação de concordância entre a cultura e o PCR na detecção do *Enterococcus/E.faecalis* pela fração de concordância e discordância dos métodos.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do aumento da temperatura na superfície radicular externa durante irradiação do canal radicular

A Figura 5.1 demonstra uma imagem capturada pela câmera termográfica do aquecimento de uma amostra durante a irradiação, que correlaciona na imagem adquirida os picos de temperatura medidos com uma escala de cores representativas, conforme observado à direita na figura abaixo.

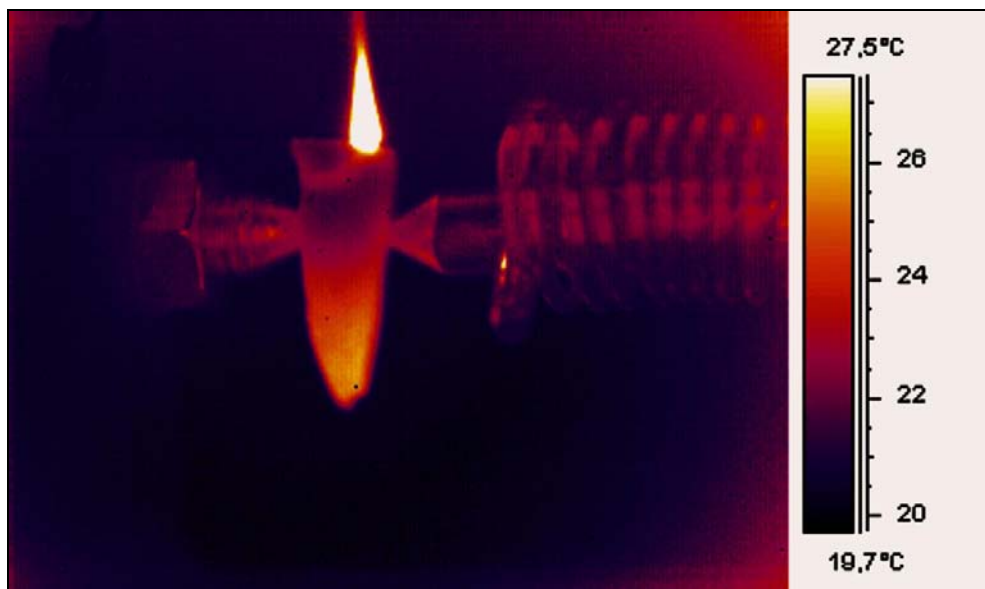


Figura 5.1 – Imagem termográfica adquirida durante a irradiação da amostra pelo laser de diodo

As temperaturas médias dos grupos CW e PL medidas pela câmera termográfica na superfície radicular externa das amostras estão ilustradas na Figura 5.2. A temperatura máxima registrada na amostra irradiada foi identificada automaticamente pelo sistema (linha superior). As temperaturas nos terços apical, médio e cervical foram identificadas após o operador determinar na imagem termográfica os pontos de análise nas referidas regiões, de acordo com os critérios preestabelecidos. As linhas escuras identificadas nas figuras representam a temperatura na região apical. Abaixo dessa, seguem na seqüência as linhas representativas dos terços médio e cervical, respectivamente.

Os valores da temperatura máxima registrada estiveram sempre próximos aos valores do terço apical, confirmando o crítico aquecimento nessa região. Os valores da temperatura medidos no terço apical foram sempre maiores que os registrados nas regiões média e cervical nos grupos CW e PL. O comportamento gráfico (Figura 5.2) ilustra o rápido decréscimo da temperatura após a irradiação ser interrompida, independentemente do regime de emissão do laser (contínuo ou pulsado). Destaca-se ainda, especialmente no grupo PL, que o resfriamento da amostra irradiada levou aproximadamente 20 segundos para o decréscimo da temperatura alcançar valores próximos à temperatura inicial.

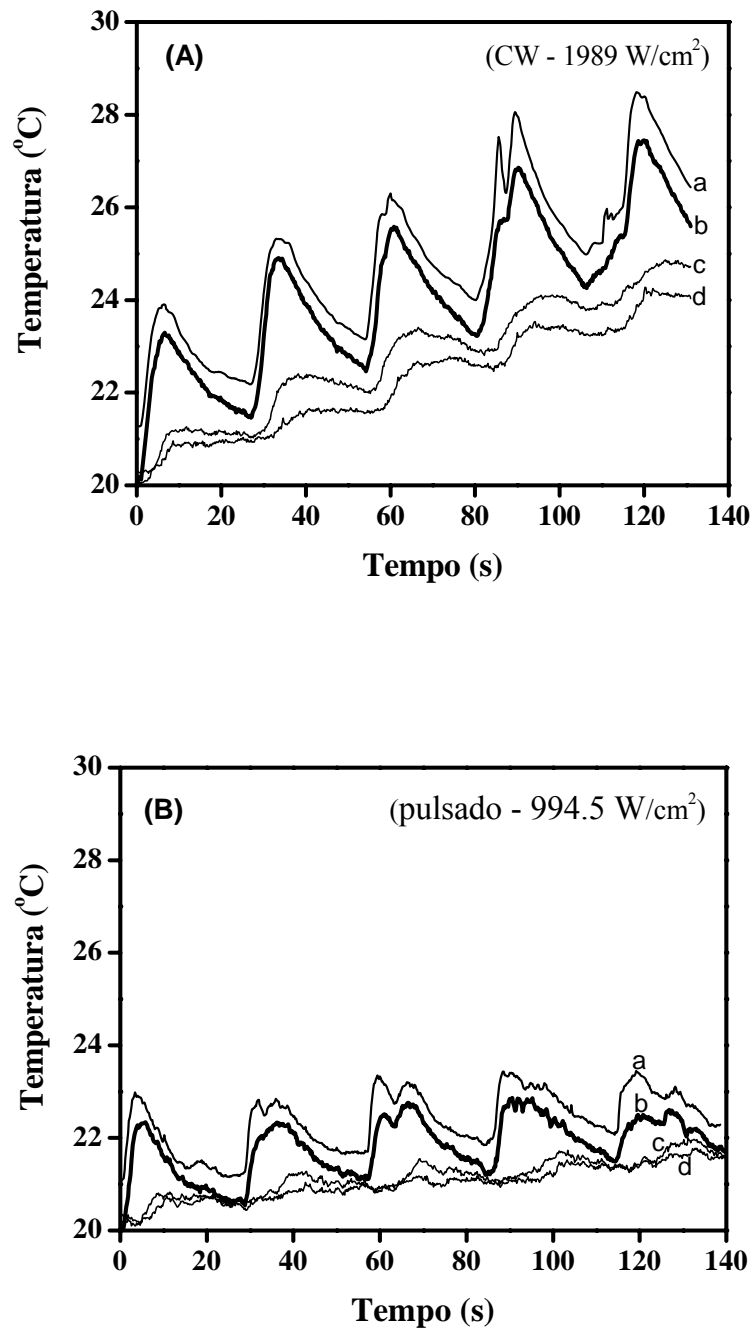


Figura 5.2 – Comportamento médio da temperatura máxima (a) e das temperaturas nos terços apical (b), médio (c) e cervical (d) medidas pela câmera termográfica na superfície radicular externa das amostras dos grupos CW (A) e PL (B)

A tabela 5.1 exibe os valores da variação de temperatura média, mínima e máxima na região apical no quinto ciclo de irradiação. Nota-se no grupo CW maior variação de temperatura que no grupo PL. A variação de temperatura máxima nos grupos CW e PL foi inferior ao limite crítico de 10 °C, assumido como referência.

A temperatura mediana máxima calculada pelo método de *Wilcoxon* ($p < 0,05$) na região apical foi de 8,6 °C no regime de emissão contínuo e 3,3 °C durante a irradiação pulsada.

Tabela 5.1 – Variações da temperatura medidas na região apical no último ciclo de irradiação

| Grupos | <i>n</i> | ΔT médio (°C) | Desvio Padrão (°C) | ΔT Mínimo (°C) | ΔT Máximo (°C) |
|---------------|-----------------|---|-------------------------------|--|--|
| CW | 10 | 3,6 | 2,3 | 0,9 | 7,8 |
| PL | 10 | 2,0 | 1,1 | 0,9 | 4,3 |

5.2 Avaliação das alterações morfológicas nas paredes do canal radicular

As alterações morfológicas ocorridas na dentina do canal radicular das amostras dos grupos controle e laser, Grupo CW e Grupo PL, foram avaliadas qualitativamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figuras 5.3 a 5.5). As micrografias eletrônicas dos terços apical e médio de amostra irradiada pelo laser de diodo sob o regime de emissão contínuo estão respectivamente representadas nas Figuras 5.3-A e 5.3-B. Enquanto as imagens microscópicas dos referidos terços das amostras irradiadas sob o regime pulsado

(grupo PL) e não irradiadas (grupo controle) estão representadas nas Figuras 5.4-A, 5.4-B, 5.5-A e 5.5-B, nesta ordem.

Observa-se no terço apical das amostras irradiadas pelo laser de diodo (Grupo CW e Grupo PL), Figuras 5.3-A e 5.4-A, o selamento da abertura dos túbulos dentinários exibindo superfície indicativa de fusão. As micrografias do terço médio das amostras irradiadas (Figuras 5.3-B e 5.4-B) revelaram que as entradas dos túbulos dentinários permaneceram abertas.

A avaliação microscópica dos terços apical e médio nas amostras não irradiadas, Figuras 5.5-A e B, não revelou nenhum fechamento da entrada dos túbulos.

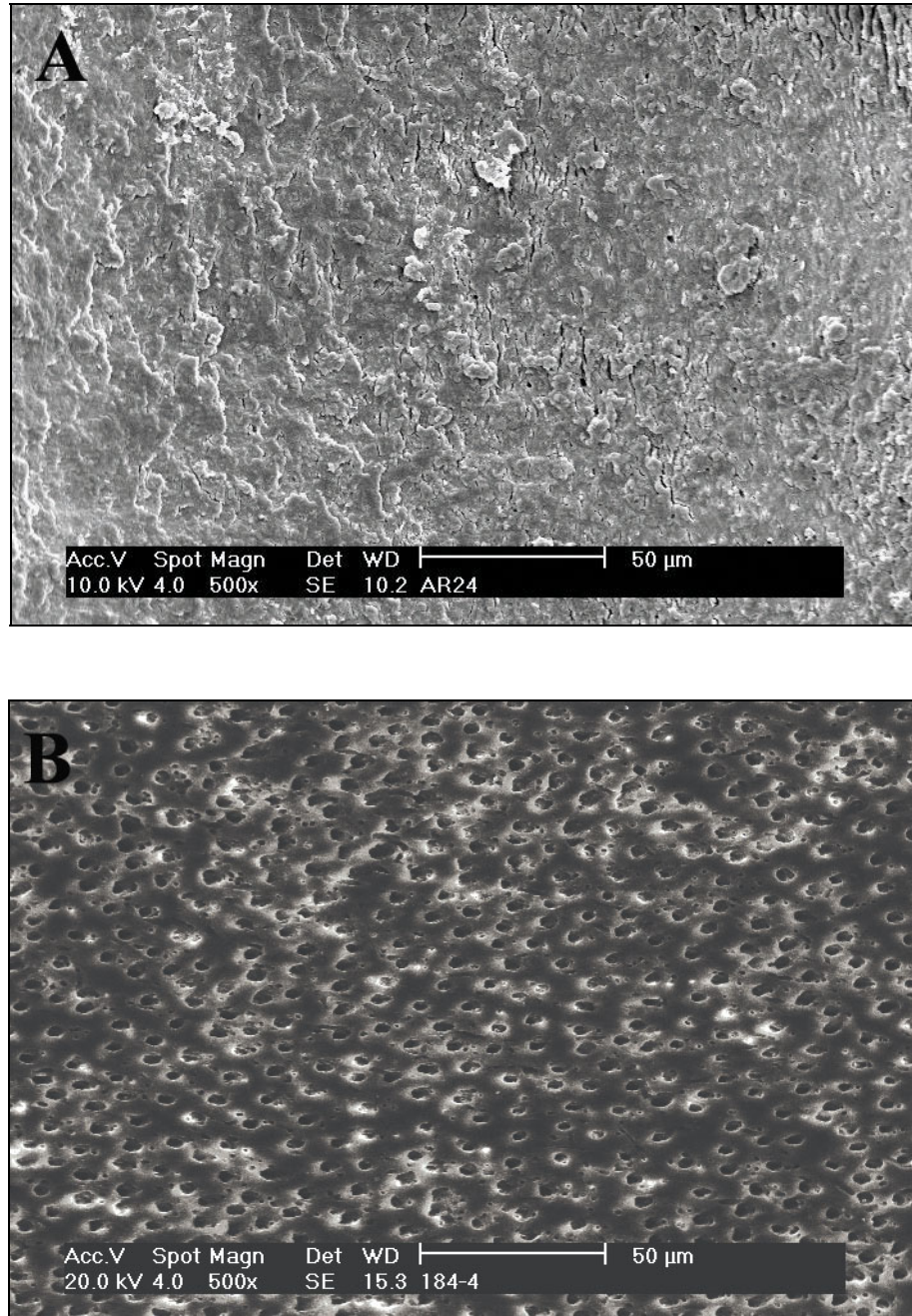


Figura 5.3 – Micrografias eletrônicas dos terços apical (A) e médio (B) de amostra irradiada pelo laser de diodo sob o regime de emissão contínuo (grupo CW)

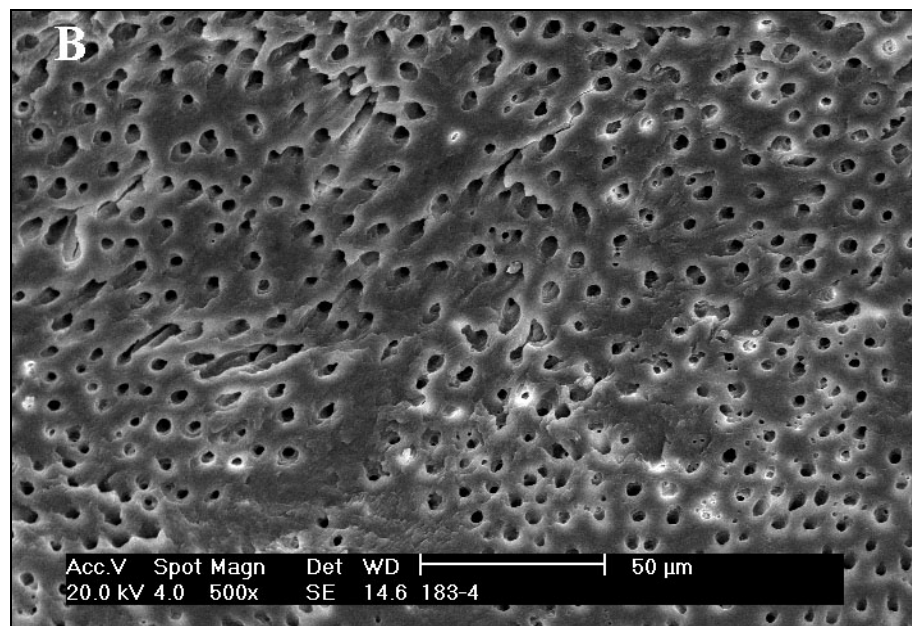
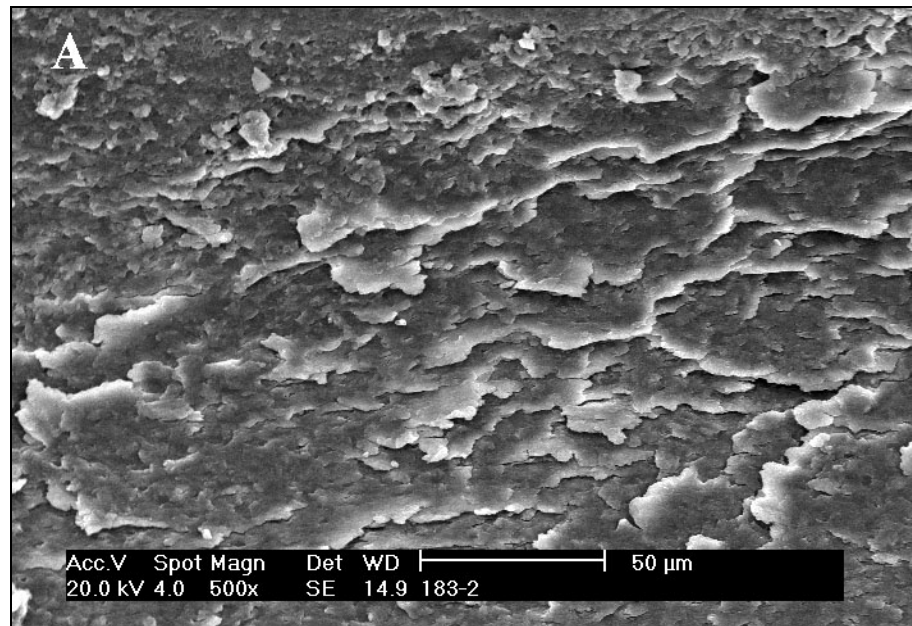


Figura 5.4 – Micrografias eletrônicas dos terços apical (A) e médio (B) de amostra irradiada pelo laser de diodo sob o regime de emissão pulsado (grupo PL)

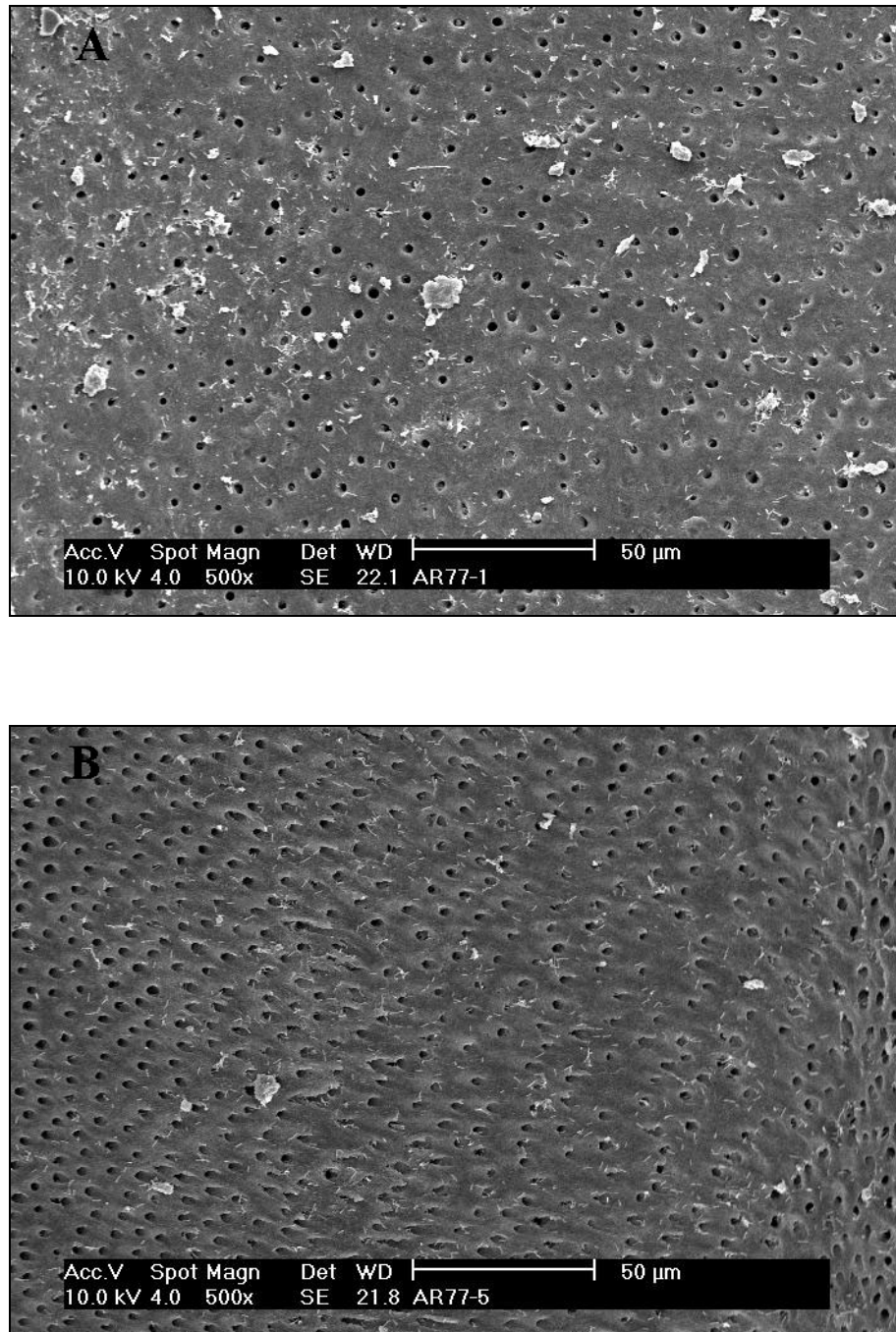


Figura 5.5 – Micrografias eletrônicas dos terços apical (A) e médio (B) de amostra não irradiada (grupo controle)

5.3 Avaliação da infiltração marginal apical

As médias de infiltração marginal apical mensuradas pela penetração linear do corante azul de metileno a 2 %, medidas em milímetros, a partir do preparo apical ao limite mais cervical de penetração do corante, assim como os valores máximo e mínimo e o desvio padrão de cada grupo, estão representados na tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Valores máximos, mínimos e médios de infiltração marginal apical, em milímetros, mediana e desvio padrão obtidos em função dos grupos de tratamentos (controle e laser) e cimentos endodônticos avaliados (NR – N-Rickert, AH – AH Plus, AP – Apexit)

| Grupo | n | Média | Mediana | Desvio padrão | Máximo | Mínimo |
|--------------|----------|--------------|----------------|----------------------|---------------|---------------|
| Controle NR | 8 | 0,74 | 0,58 | 0,82 | 2,27 | 0 |
| Controle AP | 10 | 2,15 | 1,31 | 1,88 | 5,0 | 0,5 |
| Controle AH | 12 | 1,50 | 1,30 | 1,87 | 6,75 | 0 |
| Laser NR | 8 | 0,84 | 0,18 | 1,49 | 4,12 | 0 |
| Laser AP | 8 | 0,50 | 0,37 | 0,54 | 1,11 | 0 |
| Laser AH | 9 | 0,78 | 0,87 | 0,76 | 2,25 | 0 |

Foram preparadas 90 amostras distribuídas igualmente entre os 6 grupos experimentais. Entretanto, o processo de clivagem das amostras comprometeu a avaliação da infiltração marginal apical em 35 amostras pela fragmentação inadequada, especialmente na região apical, inviabilizando a avaliação da penetração do corante nessas amostras.

A Figura 5.6 ilustra as médias de infiltração e os desvios padrão dos grupos experimentais. Notam-se menores níveis de infiltração nos grupos irradiados pelo laser de diodo, assim como no grupo controle obturado pelo cimento N-Rickert. Os maiores níveis médios de infiltração foram observados nos grupos controle obturados pelos cimentos Apexit e AH Plus.

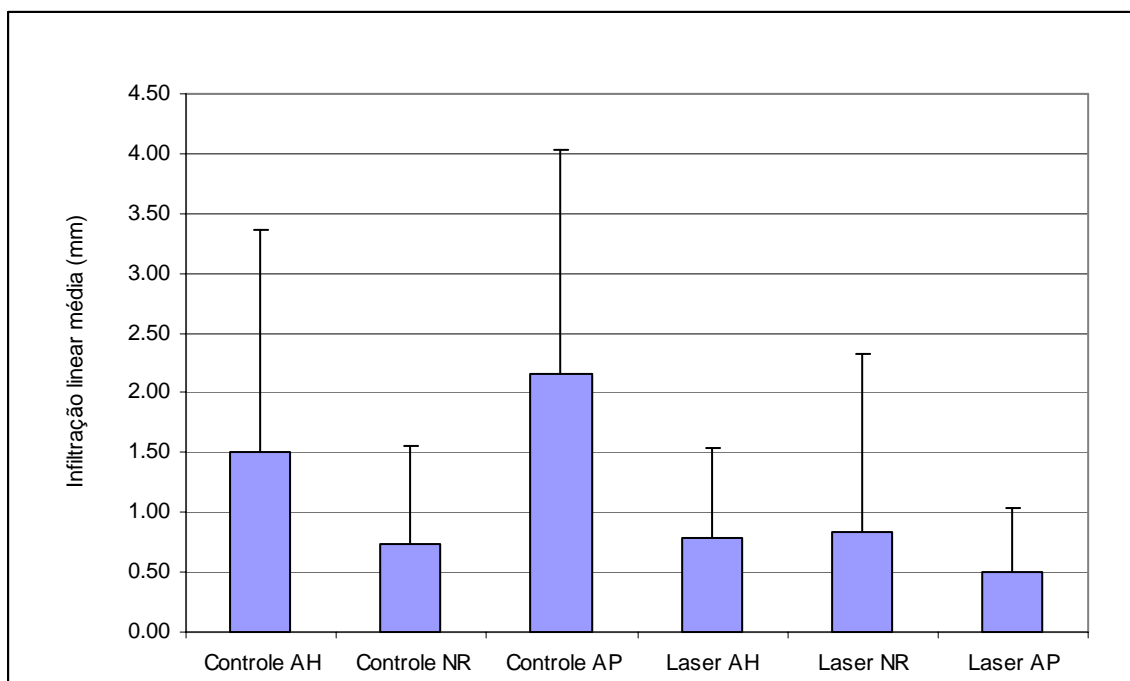


Figura 5.6 – Infiltração linear média dos grupos experimentais e os respectivos valores de desvio padrão (NR – N-Rickert, AH – AH Plus, AP – Apexit)

O teste de normalidade Shapiro-Wilk rejeitou a hipótese nula de normalidade para o nível de significância de 95 % para a maioria dos grupos experimentais, considerando a distribuição não-normal dos dados mensurados nos grupos: Controle AH, Controle AP, Laser NR e Laser AP. Assim, a distribuição foi considerada normal apenas nos grupos Controle NR e Laser AH.

Usando o método Mann-Whitney, foram testadas as hipóteses nulas de igualdade entre os pares de interesse dos grupos investigados, destacados na cor cinza na Tabela 5.3, contra a hipótese alternativa de superioridade de uma das medianas (a maior de cada grupo) ao nível de significância igual a 95% ($p \leq 0,05$).

Tabela 5.3 – Valores de mediana ()* e de probabilidade ($p \leq 0,05$ %) avaliados pelo método de Mann-Whitney

| Grupos | Controle AH (1,30)* | Controle NR (0,58)* | Controle AP (1,31)* | Laser AH (0,87)* | Laser NR (0,18)* |
|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|---------------------|---------------------|
| Controle NR (0,58)* | $p = 0,1924$ ns | - | - | - | - |
| Controle AP (1,31)* | $p = 0,2191$ ns | $p = 0,0501$ ns | - | - | - |
| Laser AH (0,87)* | $p = 0,2313$ ns | $p = 0,4808$ ns | $p = 0,0557$ ns | - | - |
| Laser NR (0,18)* | $p = 0,2027$ ns | $p = 0,3217$ ns | $p = 0,0179$ s | $p = 0,2457$ ns | - |
| Laser AP (0,37)* | $p = 0,092$ ns | $p = 0,2474$ ns | $p = 0,0280$ s | $p = 0,2983$ ns | $p = 0,5000$ ns |

s = significante ou ns = não significante em nível de 5%

(NR – N-Rickert, AH – AH Plus, AP – Apexit)

Os resultados demonstraram não haver diferença significativa entre os tratamentos das paredes do canal radicular, irrigação de EDTA-T ou irradiação com laser de diodo, quando os cimentos obturadores AH Plus ou N-Rickert foram utilizados. Entre as avaliações de interesse a esse estudo, foi verificada diferença significativa entre os grupos Controle AP e Laser AP, conforme Tabela 5.3.

5.4 Avaliação microbiológica

Foram coletadas amostras de 23 dentes com infecção endodôntica primária, divididas aleatoriamente em dois grupos quanto à terapêutica realizada. Catorze dentes foram submetidos à terapêutica endodôntica tradicional (Grupo controle) e nove dentes foram tratados pela associação desta com a irradiação pelo laser de diodo (Grupo laser).

As coletas do conteúdo microbiano do canal radicular foram realizadas em momentos distintos do tratamento. Na primeira sessão foram realizadas duas coletas, uma no início da sessão, imediatamente após a cirurgia de acesso (coleta 01), e outra no final da sessão, após o preparo químico-cirúrgico (coleta 02). O preparo químico-cirúrgico do grupo controle compreendeu o uso de instrumentos manuais e de solução de NaOCl a 0,5 %, enquanto no grupo laser, após as seqüências de instrumentação e irrigação, foi realizada a irradiação do canal radicular pelo laser de diodo. As coletas 03 e 04 foram realizadas na segunda e terceira sessões, respectivamente. No grupo controle as coletas 03 e 04 foram realizadas após a remoção do hidróxido de cálcio, utilizado como medicação intracanal entre sessões, pela irrigação de solução de ácido cítrico a 0,5 % e posteriormente por irrigação da solução salina esterilizada. No grupo laser as coletas 03 e 04 foram realizadas após a remoção do hidróxido de cálcio, conforme descrito acima, e subsequente irradiação do canal pelo laser de diodo. Portanto, 56 amostras foram coletadas no grupo controle e 36, no grupo laser, as quais foram processadas para análise por cultura e PCR.

A cultura destinou-se a determinação do número total de microrganismos anaeróbios viáveis, de *Lactobacillus* e de *Enterococcus*. Os dados sobre o número de unidades formadoras de colônias dos microrganismos anaeróbios viáveis determinados nas amostras do grupo controle e laser estão apresentados nas tabelas 5.4 e 5.5, respectivamente. A representação gráfica em escala logarítmica está ilustrada na Figura 5.7. Microrganismos

anaeróbios viáveis cultiváveis foram identificados em todas as amostras coletadas no início do tratamento (coleta 01) em ambos os grupos. Ao final do tratamento (coleta 04) apenas uma amostra do grupo laser apresentou microrganismos viáveis, enquanto estes foram detectados em quatro amostras do grupo controle. Observa-se o declínio da prevalência dos microrganismos viáveis ao longo do tratamento nos grupos controle e laser.

Tabela 5.4 – Número de microrganismos viáveis (UFC/amostra) determinados nas amostras obtidas no grupo controle antes do tratamento (coleta 01), imediatamente após o PQC (coleta 02), no início da segunda sessão (coleta 03) e no início da terceira sessão (coleta 04)

| Sítios | UFC de microrganismos viáveis/amostra | | | |
|---------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Coleta 01 | Coleta 02 | Coleta 03 | Coleta 04 |
| C1 | $388,50 \times 10^2$ | 0 | 0 | 0 |
| C2 | 22.200×10^2 | 0 | 0 | 0 |
| C3 | 48×10^2 | $4,50 \times 10^2$ | $40,50 \times 10^2$ | 0 |
| C4 | $3,54 \times 10^2$ | $94,50 \times 10^2$ | 0 | 0 |
| C5 | $2.299,50 \times 10^2$ | 0 | 0 | 0 |
| C6 | 267×10^2 | 0 | $4,50 \times 10^2$ | 0 |
| C7 | $265,50 \times 10^2$ | 0 | 0 | 0 |
| C8 | $13,50 \times 10^2$ | 0 | $0,12 \times 10^2$ | 0 |
| C9 | 150×10^2 | $1,50 \times 10^2$ | 0 | 0 |
| C10 | $12,78 \times 10^2$ | 0 | 0 | 0 |
| C11 | 432×10^2 | $4,50 \times 10^2$ | $0,015 \times 10^2$ | $0,09 \times 10^2$ |
| C12 | 105×10^2 | $1,50 \times 10^2$ | 0 | $0,18 \times 10^2$ |
| C13 | $0,135 \times 10^2$ | $0,045 \times 10^2$ | 0 | $0,045 \times 10^2$ |
| C14 | 23.700×10^2 | 0 | 6 | $2,70 \times 10^2$ |
| Média | $3,6 \times 10^5$ | $0,76 \times 10^3$ | $0,32 \times 10^3$ | $2,1 \times 10^1$ |
| Desvio Padrão | $8,2 \times 10^5$ | $2,4 \times 10^3$ | 1×10^3 | $6,9 \times 10^1$ |

Tabela 5.5 – Número de microrganismos viáveis (UFC/amostra) determinados nas amostras obtidas no grupo laser antes do tratamento (coleta 01), imediatamente após o PQC (coleta 02), no início da segunda sessão (coleta 03) e no início da terceira sessão (coleta 04)

| Sítios | UFC de microrganismos viáveis/amostra | | | |
|--------|---------------------------------------|---------------------|-----------|---------------------|
| | Coleta 01 | Coleta 02 | Coleta 03 | Coleta 04 |
| L1 | 639×10^2 | 0 | 0 | $0,105 \times 10^2$ |
| L2 | 5.850×10^2 | 0 | 0 | 0 |
| L3 | $3,33 \times 10^2$ | 0 | 0 | 0 |
| L4 | 495×10^2 | $0,03 \times 10^2$ | 0 | 0 |
| L5 | 51×10^2 | $0,015 \times 10^2$ | 0 | 0 |
| L6 | $2,31 \times 10^2$ | 0 | 0 | 0 |
| L7 | $0,915 \times 10^2$ | 0 | 0 | 0 |
| L8 | $106,5 \times 10^2$ | $0,015 \times 10^2$ | 0 | 0 |

| | | | | |
|---------------|-----------------------|------|---|--------------------|
| L9 | 103.650×10^2 | 0 | 0 | 0 |
| Média | $12,0 \times 10^5$ | 0,67 | 0 | $0,12 \times 10^1$ |
| Desvio Padrão | $34,3 \times 10^5$ | 1,02 | 0 | 3,3 |

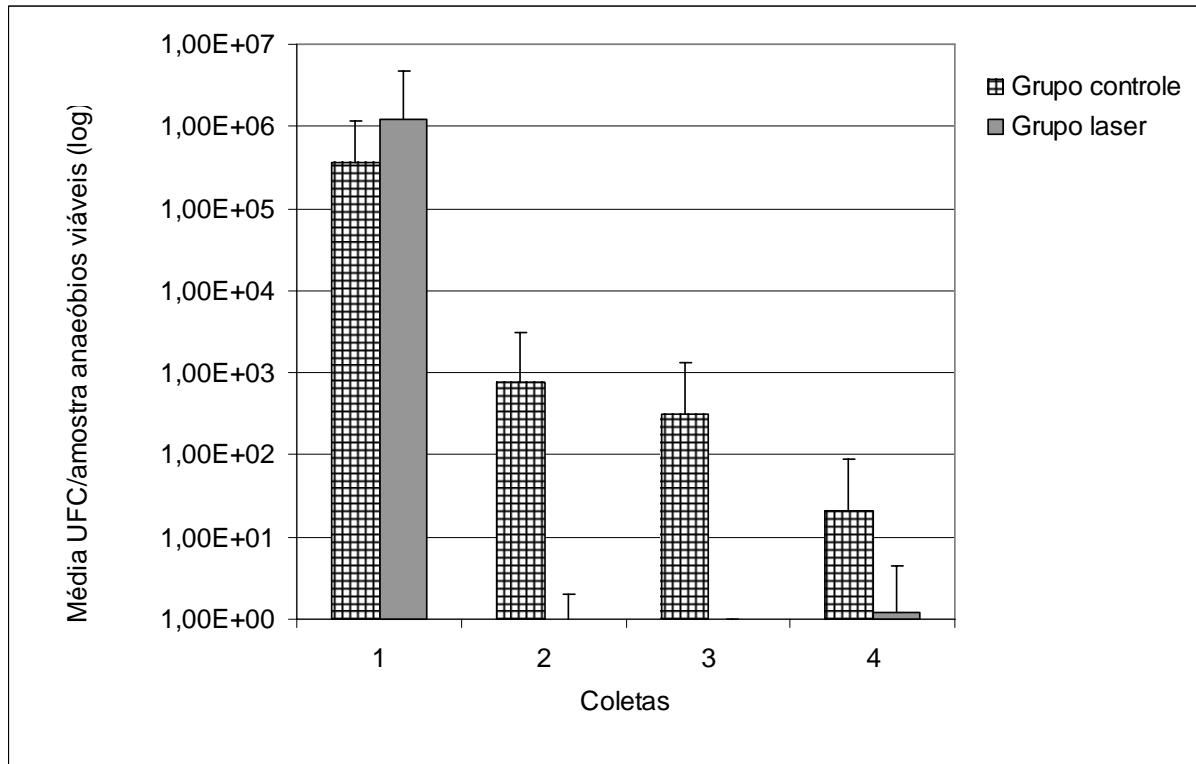


Figura 5.7– Médias em escala logarítmica dos microrganismos anaeróbios viáveis (UFC/amostra) determinadas nas coletas 01, 02, 03 e 04 dos grupos controle e laser

Foi verificado o comportamento da distribuição dos dados de UFC de microrganismos viáveis por amostra nas coletas 01, 02, 03 e 04 dos grupos controle e laser. Os resultados do teste de normalidade (*Shapiro-Wilk* $p < 0,05$) do grupo controle e do grupo laser são apresentados nas tabelas 5.6 e 5.7, respectivamente. A hipótese nula do teste assume a normalidade da distribuição dos dados. No grupo controle os dados das coletas 02, 03 e 04 não apresentaram distribuição normal, conforme observado na tabela 5.6. Já os dados da coleta 01 do grupo controle e os dados 01 e 02 do grupo laser não apresentam evidências

suficientes para rejeitar a hipótese de normalidade (tabelas 5.6 e 5.7).

Tabela 5.6 – Resultado do teste de normalidade (*Shapiro-Wilk* - $p < 0,05$) dos dados das UFC de microrganismos viáveis por amostra no grupo controle nas coletas 01, 02, 03 e 04

| | Coleta 01 | Coleta 02 | Coleta 03 | Coleta 04 |
|-----------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| Valor de n | 14 | 14 | 14 | 14 |
| Média | $3,6 \times 10^5$ | $0,76 \times 10^3$ | $0,32 \times 10^3$ | $2,1 \times 10^1$ |
| Desvio padrão | $8,2 \times 10^5$ | $2,4 \times 10^3$ | 1×10^3 | $6,9 \times 10^1$ |
| p | 0.0058 | 0.0041 | 0.0042 | 0.0041 |

Tabela 5.7 – Resultado do teste de normalidade (*Shapiro-Wilk* - $p < 0,05$) dos dados das UFC de microrganismos viáveis por amostra no grupo laser nas coletas 01, 02, 03 e 04

| | Coleta 01 | Coleta 02 | Coleta 03 | Coleta 04 |
|-----------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|
| Valor de n | 9 | 9 | 9 | 9 |
| Média | $12,0 \times 10^5$ | 0,67 | 0 | $0,12 \times 10^1$ |
| Desvio padrão | $34,3 \times 10^5$ | 1,02 | 0 | 3,3 |
| P | 0.0055 | 0.0083 | - | - |

A comparação entre as medianas das UFC de microrganismos viáveis por amostra dos grupos controle e laser foi avaliada em cada uma das fases do tratamento pelo teste de *Mann-Whitney*. Não houve diferença significativa na quantidade de UFC de microrganismos viáveis por amostra nos grupos controle e laser em nenhuma das coletas realizadas. Os valores de p obtidos na comparação das medianas das UFC/amostras entre os grupos foram sempre

maiores que o nível de decisão assumido 0,05: Controle X Laser (coleta 01) – $p = 0,9498$; Controle X Laser (coleta 02) – $p = 0,3447$; Controle X Laser (coleta 03) – $p = 0,1564$ e Controle X Laser (coleta 04) – $p = 0,4884$.

O teste de *Wilcoxon* ($p = 0,05$) foi utilizado na comparação das medianas UFC de microrganismos viáveis por amostra das coletas realizadas em cada um dos grupos. A hipótese nula assume não haver diferença entre os fatores avaliados. Os valores das probabilidades são apresentados na tabela 5.8. Foi observada diferença estatisticamente significativa na redução das medianas de UFC de microrganismos viáveis por amostra da coleta 01 quando comparada às coletas 02, 03 e 04 em ambos os grupos. Não houve redução significativa das medianas de UFC de microrganismos viáveis por amostra entre a coleta 02 e a coleta 03 e entre a coleta 03 e a coleta 04 nos grupos controle e laser (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 – Avaliação entre as médias das UFC de microrganismos viáveis por amostra das coletas realizadas em cada um dos grupos nas diferentes fases do tratamento. Teste de *Wilcoxon* ($p < 0,05$)

| Coletas | Grupo Controle | Grupo Laser |
|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| Coleta 01 X Coleta 02 | $p = 0,0029^*$ | $p = 0,0077^*$ |
| Coleta 01 X Coleta 03 | $p = 0,0010^*$ | $p = 0,0077^*$ |
| Coleta 01 X Coleta 04 | $p = 0,0010^*$ | $p = 0,0077^*$ |
| Coleta 02 X Coleta 03 | $p = 0,7671$ | $p = 0,1088$ |
| Coleta 03 X Coleta 04 | $p = 0,7353$ | $p = 0,3173$ |

* diferença significante – $p < 0,05$.

As tabelas 5.9 e 5.10 exibem o número de amostras positivas para o gênero *Enterococcus*, detectado por cultura (UFC/amostra), e para o *E. faecalis* (+/-), identificado

por PCR, nos grupos controle e laser, respectivamente.

Tabela 5.9 – Número de amostras positivas para o gênero *Enterococcus*, detectado por cultura (UFC/amostra), e para *E. faecalis* (+/-), identificado por PCR, no grupo controle nas diferentes fases do estudo

| Sítios | Coleta 01 | | Coleta 02 | | Coleta 03 | | Coleta 04 | |
|--------------|--------------------------|-----|-----------|-----|-----------|-----|-----------|-----|
| | Cultura | PCR | Cultura | PCR | Cultura | PCR | Cultura | PCR |
| C1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C2 | 388,50 x 10 ² | + | - | - | - | - | - | - |
| C3 | - | x | - | - | - | - | - | - |
| C4 | - | + | - | x | - | + | - | + |
| C5 | - | + | - | - | - | - | - | + |
| C6 | 267 x 10 ² | + | - | - | - | - | - | - |
| C7 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C8 | 10,14 x 10 ² | - | - | - | - | - | - | - |
| C9 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C10 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C11 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C12 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C13 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C14 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Total | 03 | 04 | 0 | 0 | 0 | 01 | 0 | 02 |

x = excluído

Tabela 5.10 – Número de amostras positivas para o gênero *Enterococcus*, detectado por cultura (UFC/amostra), e para *E. faecalis* (+/-), identificado por PCR, no grupo laser nas diferentes fases do estudo

| Sítios | Coleta 01 | | Coleta 02 | | Coleta 03 | | Coleta 04 | |
|--------------|-----------------------|-----|-----------|-----|-----------|-----|-----------|-----|
| | Cultura | PCR | Cultura | PCR | Cultura | PCR | Cultura | PCR |
| L1 | 285 x 10 ² | + | - | - | - | - | - | - |
| L2 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L3 | - | + | - | - | - | - | - | - |
| L4 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L5 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L6 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L7 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L8 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L9 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Total | 01 | 02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

A Figura 5.8 exibe o histograma das porcentagens dos *Enterococcus*, detectados por cultura ou PCR, entre o grupo controle e laser nas diferentes fases do tratamento.

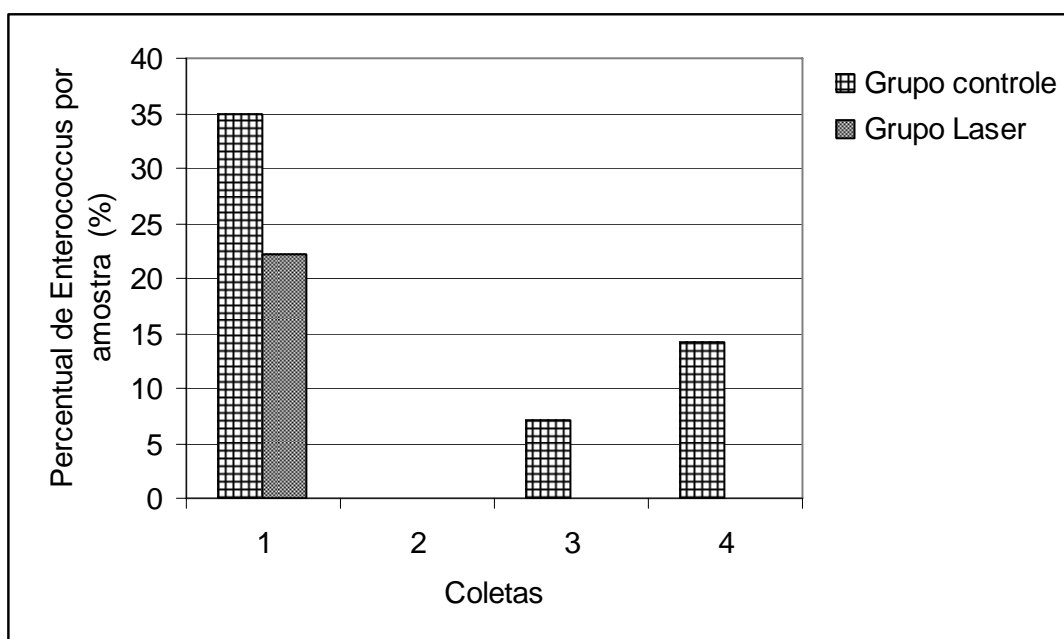


Figura 5.8 – Percentual de *Enterococcus* detectados por cultura ou PCR nas diferentes fases do tratamento nos grupos controle e laser

A tabela 5.11 demonstra o número de amostras positivas para *Lactobacillus* detectado por cultura (UFC/amostra) nos grupos controle. No grupo laser não foi detectado *Lactobacillus* em nenhuma fase.

Culturas positivas de *Lactobacillus* só foram observadas na coleta 01 do grupo controle, sugerindo a eficiência do tratamento na sua redução (Tabela 5.11).

A determinação da porcentagem dos microrganismos anaeróbios viáveis, gênero

Enterococcus e *Lactobacillus* por cultura nos grupos controle está apresentada na tabela 5.12.

Tabela 5.11 – Amostras positivas para o *Lactobacillus* detectado por cultura (UFC/amostra) no grupo controle

| Sítios | UFC de <i>Lactobacillus</i> /amostra | | | |
|--------|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | Coleta 01 | Coleta 02 | Coleta 03 | Coleta 04 |
| C1 | - | - | - | - |
| C2 | - | - | - | - |
| C3 | - | - | - | - |
| C4 | - | - | - | - |
| C5 | - | - | - | - |
| C6 | - | - | - | - |
| C7 | - | - | - | - |
| C8 | - | - | - | - |
| C9 | - | - | - | - |
| C10 | - | - | - | - |
| C11 | - | - | - | - |
| C12 | 16,50 x 10 ² | - | - | - |
| C13 | 4,02 x 10 ² | - | - | - |
| C14 | - | - | - | - |

Tabela 5.12 – Porcentagem de microrganismos anaeróbios viáveis, *Enterococcus* e *Lactobacillus* em canais radiculares identificados por cultura no grupo controle (n =14)

| | Anaeróbios viáveis | <i>Enterococcus</i> | <i>Lactobacillus</i> |
|-----------|--------------------|---------------------|----------------------|
| Coleta 01 | 14 (100 %) | 03 (21,42 %) | 2 (14,28 %) |
| Coleta 02 | 6 (42,86 %) | 0 (0 %) | 0 (0%) |
| Coleta 03 | 5 (35,71 %) | 0 (0 %) | 0 (0%) |
| Coleta 04 | 4 (28,57%) | 0 (0 %) | 0 (0%) |

Nas amostras do grupo laser (tabela 5.13) foi detectada por cultura a presença do *Enterococcus* em apenas um sítio, enquanto o *Lactobacillus* não foi identificado em nenhuma amostra.

Tabela 5.13 – Porcentagem de microrganismos anaeróbios viáveis, *Enterococcus* e *Lactobacillus* em canais radiculares identificados por cultura no grupo laser (n = 9)

| | Anaeróbios viáveis | <i>Enterococcus</i> | <i>Lactobacillus</i> |
|-----------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Coleta 01 | 9 (100 %) | 1 (11,11%) | 0 (0 %) |
| Coleta 02 | 3 (33,33 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |
| Coleta 03 | 0 (0 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |
| Coleta 04 | 1 (11,11%) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |

A Figura 5.9 exibe o histograma das porcentagens dos microrganismos viáveis entre o grupo controle e laser nas diferentes fases do tratamento.

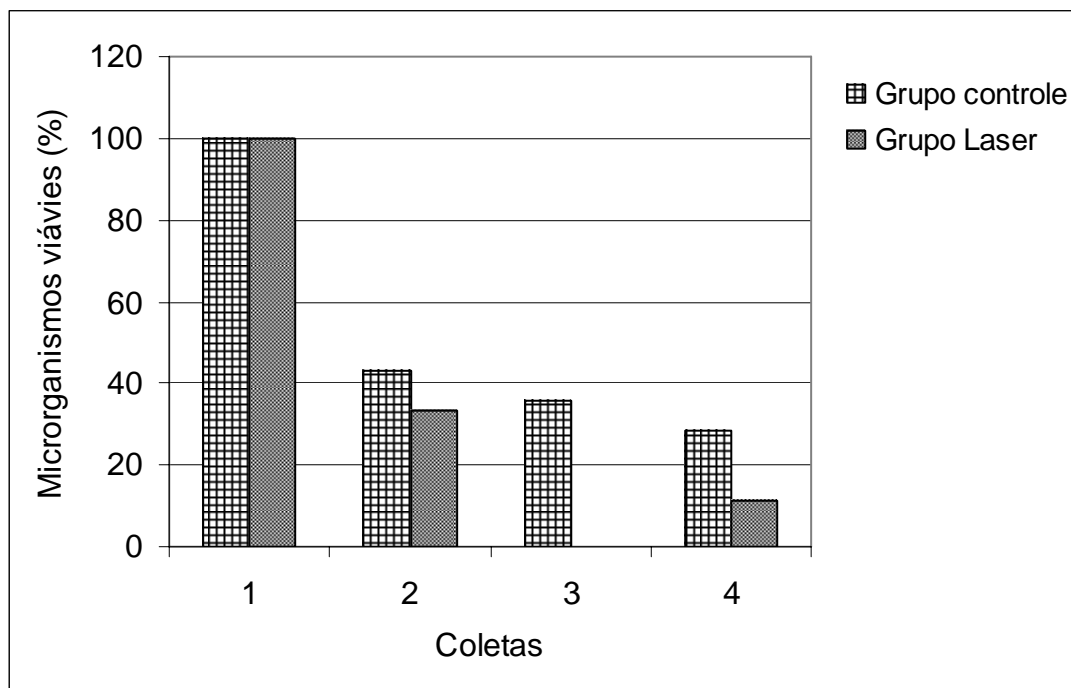


Figura 5.9 – Distribuição das porcentagens dos microrganismos viáveis entre os grupos controle e laser nas diferentes fases do tratamento

Pelas técnicas de cultura e PCR foi determinada a porcentagem de *Enterococcus* por microrganismos anaeróbios viáveis em cada fase do estudo (Figura 5.10). A porcentagem de *Lactobacillus* por anaeróbios viáveis no grupo controle foi de 14,28 % na coleta 01, reduzindo a 0 % nas demais fases do tratamento. No grupo laser a proporção do *Lactobacillus* foi sempre igual a 0%.

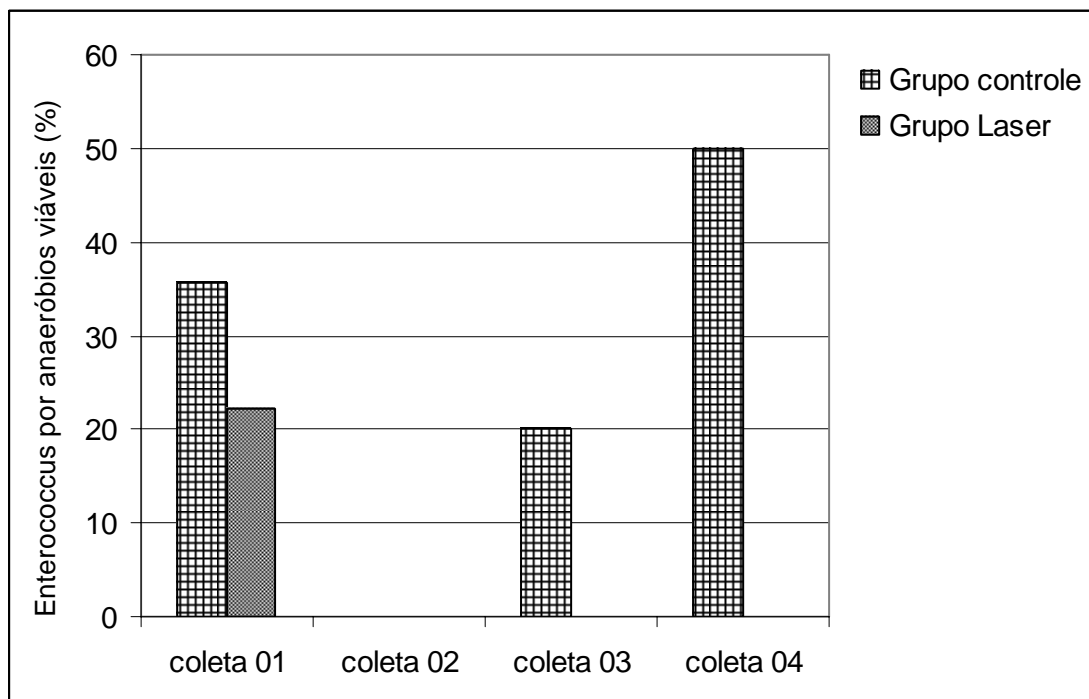


Figura 5.10 – Porcentagem de *Enterococcus* por microrganismos anaeróbios viáveis nos grupos controle e laser

A porcentagem de distribuição do *Enterococcus/E. faecalis* detectado, por cultura ou PCR, nas coletas 01, 02, 03 e 04 é apresentada na tabela 5.14. Não houve diferença significativa (Teste de Fisher - $p < 0,05$) na distribuição das porcentagens dos sítios positivos e negativos para *Enterococcus/E. faecalis* detectados por cultura ou PCR entre os grupos controle e laser, nas diferentes fases do tratamento.

Tabela 5.14 – Distribuição das porcentagens de sítios positivos e negativos para *Enterococcus/E. faecalis* detectados por cultura ou PCR nas diferentes fases do tratamento

| Grupos | Coleta 01 | | Coleta 02 | | Coleta 03 | | Coleta 04 | |
|-------------------|---------------|---------------|-----------|--------------|--------------|----------------|---------------|----------------|
| | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| Controle n =14 | 5 (35,71%) | 9 (64,29%) | 0 (0%) | 14 (100%) | 1 (7,14%) | 13 (92,86%) | 2 (14,28%) | 12 (85,72%) |

| | | | | | | | | |
|--------------|----------|----------|------|--------|------|--------|------|--------|
| Lasar | 2 | 7 | 0 | 9 | 0 | 9 | 0 | 9 |
| n = 9 | (22,22%) | (77,78%) | (0%) | (100%) | (0%) | (100%) | (0%) | (100%) |
| Total | 7 | 16 | 0 | 23 | 1 | 22 | 2 | 21 |

A reação de PCR para detecção de *E. faecalis* foi realizada usando como molde DNA das amostras obtidas nas diferentes fases do tratamento. A análise da presença de *E. faecalis* por PCR não foi realizada em duas amostras do grupo controle (paciente C3 – coleta 01 e paciente C4 – coleta 02) por problemas de manipulação. Os dados de detecção de *E. faecalis* por PCR estão apresentados na tabela 5.9 e 5.10.

A relação de concordância entre os testes utilizados na detecção do *Enterococcus/E.faecalis*, cultura e PCR, foi avaliada. Foram totalizados os resultados concordantes (positivo-positivo e negativo-negativo) e os discordantes (negativo-positivo e positivo-negativo), conforme apresentado na tabela 5.15. O percentual dos resultados de concordância entre as técnicas foi de 92,2 %, enquanto 7,8% dos resultados foram discordantes. Os testes de cultura e PCR exibiram maior número de resultados concordantes do que discordantes na detecção de *Enterococcus/E.faecalis*.

Tabela 5.15 – Números de concordância e discordância na identificação do *Enterococcus/E.faecalis* por cultura e PCR

| Resultado cultura x PCR | Grupo controle | Grupo Lasar | Total |
|---------------------------------------|-----------------------|--------------------|--------------|
| sítio positivo cultura – positivo PCR | 2 | 1 | 3 |
| sítio positivo cultura – negativo PCR | 1 | 0 | 1 |
| sítio negativo cultura – positivo PCR | 5 | 1 | 6 |

| | | | |
|---------------------------------------|----|----|----|
| sítio negativo cultura – negativo PCR | 46 | 34 | 80 |
| Total | 54 | 36 | 90 |

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Avaliação do aumento da temperatura na superfície radicular externa durante a irradiação do canal radicular

A maior parte da radiação absorvida pela matéria é convertida em calor, que não fica confinado ao local irradiado pelo laser, pode propagar-se às regiões adjacentes e eventualmente distantes da região irradiada dependendo da condutividade e da capacidade térmicas do tecido-alvo. Pelo exposto, compreende-se a importância de avaliar os efeitos térmicos da irradiação laser, especialmente nas aplicações biológicas, evitando danos à vitalidade de estruturas adjacentes. Este cuidado também é pertinente às aplicações do laser em Endodontia, de forma que impeça que as estruturas periodontais sejam lesadas pelo excessivo aumento da temperatura resultante da irradiação intracanal.

O coeficiente de absorção da dentina para o comprimento de onda do laser de diodo na região de 80 nm utilizado neste estudo é baixo, predominando assim o espalhamento (18, 19), permitindo que os fótons sejam absorvidos em regiões afastadas do local irradiado. De acordo com a Teoria da Difusão, a intensidade do laser decresce exponencialmente em camadas mais profundas do tecido, assim a temperatura resultante nas paredes internas do canal radicular é superior à temperatura na superfície radicular externa (19, 108). Entretanto, a absorção dos fótons espalhados em camadas profundas e o calor transmitido podem resultar no risco de aumento de temperatura prejudicial aos tecidos periodontais. Por todas essas razões, é extremamente importante estimar o aumento de temperatura para determinar previamente a condição de irradiação mais apropriada à aplicação clínica do laser.

Estudos demonstraram que o aumento de temperatura é mais significativo na região apical, devido à reduzida espessura de dentina nessa região (30, 44). Foram utilizadas neste estudo raízes de incisivos inferiores pelo menor volume anatômico comparado a outros grupos dentais unirradiculares. O preparo apical dessas raízes foi realizado com lima nº 45, de forma que reduzisse a espessura do remanescente dentinário na região apical, e assim, avaliar o aumento de temperatura numa situação crítica. A maioria dos estudos, que avaliaram o aumento de temperatura durante a irradiação do canal radicular, foi conduzida em outros grupos de dentes unirradiculares, geralmente superiores (24, 25, 27, 29, 32, 35, 109). Portanto, esses resultados só podem ser extrapolados com muito cuidado a grupos dentais com menor volume anatômico, como incisivos inferiores. Os resultados obtidos neste estudo permitem extrapolar os resultados a outros grupos dentais, respeitando as condições investigadas.

A configuração geométrica da fibra utilizada neste estudo foi de superfície plana. Outros tipos de acabamento da porção final da fibra, como esférico e cônico, atuam na verdade como difusores de energia favorecendo distribuição mais homogênea de fótons ao longo do canal (28). Para minimizar os efeitos térmicos a fibra foi mantida em constante movimento durante a irradiação, aspectos que favorecem a redução do aumento de temperatura (7, 26).

A irrigação do canal radicular simultaneamente à irradiação laser favorece o menor aumento de temperatura (29). A irradiação com laser de diodo requer ausência de excesso umidade no local irradiado, já que o coeficiente de absorção desse comprimento de onda é maior para hidroxiapatita do que pela água. Previamente à irradiação do canal radicular, recomenda-se irrigação abundante, para efetiva remoção de resíduos indesejáveis, e secagem completa com cones de papel absorvente (110).

A câmera termográfica tem sido preferida ao uso de termopares nos estudos de

monitoração do aumento de temperatura, pois o sistema permite avaliar o comportamento térmico em maior área de superfície do que a análise pontual dos termopares (34). A aquisição de imagem em tempo real do comportamento térmico do corpo aquecido, promovendo a correlação das temperaturas medidas com uma escala de cores representativa, válida apenas ao corpo irradiado, é outra vantagem exibida. Além disso, o programa computacional identifica automaticamente a temperatura máxima em diferentes pontos, independentemente dos pontos de análise determinados pelo operador. Para a conversão da leitura no infravermelho em temperatura pela câmera termográfica, é necessário conhecer a emissividade do material analisado (dentina 0,91), de forma que o sistema possa ser ajustado com as propriedades da amostra avaliada (109, 111).

Vale ressaltar que a potência exibida no painel do laser foi sempre maior que os valores mensurados pelo medidor de potência/energia, após a irradiação. A perda de potência ao longo da fibra óptica é um grande problema para o clínico, já que valores inferiores ao desejado reduzem a probabilidade de sucesso do tratamento. A situação inversa é mais preocupante, caso a potência real seja maior do que a desejada efeitos deletérios podem ocorrer. Assim, o clínico deve sempre mensurar a potência do laser na saída da fibra antes e durante o tratamento, assim como limpá-la com uma gaze evitando que detritos acumulados na extremidade prejudiquem a entrega da radiação.

Nenhum estudo *in vitro* reproduz completamente as condições clínicas (31). Clinicamente, os tecidos adjacentes à região irradiada, que possuem maior condutividade térmica que o ar, associados ao fluxo sanguíneo constituem importantes agentes minimizadores ao aumento de temperatura (112). Os resultados obtidos neste estudo revelaram que a variação de temperatura nos grupos estudados não excedeu 10 °C. A variação máxima da temperatura mediana observada na emissão contínua foi de 8,6 °C, enquanto na emissão pulsada alcançou 3,3 °C. A variação máxima de temperatura no grupo CW não

excedeu o valor crítico de 10 °C considerado (23). Os menores valores de temperatura assumidos no grupo PL são explicados pela menor fluência (994 W/cm²), já que o regime de emissão do laser nesse grupo promovia 50 ms de radiação laser e 50 ms de inatividade, reduzindo o calor transportado ao tecido no período de inatividade e promovendo menor elevação da temperatura.

Os intervalos entre as irradiações são importantes para evitar o aumento da temperatura acima do valor crítico. Um dos aspectos de maior importância neste estudo foi a determinação do período de 20 s entre os ciclos de irradiação (113). Este valor é superior aos 10 segundos sugeridos na literatura, quando o canal foi irradiado por laser de diodo com potência de 1 a 1,5 W no regime de emissão contínua (32). Como observado na Figura 5.2, o pico de temperatura é alcançado em 10 s e decresce, para temperaturas seguras, em aproximadamente 20 s, em ambos os grupos. Portanto, o período de resfriamento é importante para permitir a dissipação do calor e o resfriamento do tecido.

Os resultados demonstraram que o laser de diodo, com comprimento de onda próximo a 800 nm, pode ser utilizado para aplicações endodônticas de acordo com os parâmetros investigados. O aumento de temperatura não irá exceder o limite de segurança (10 °C), quando o laser for operado no regime contínuo ou pulsado nos parâmetros medidos, se os 20 s de resfriamento forem respeitados.

6.2 Avaliação das alterações morfológicas nas paredes do canal radicular

A avaliação das alterações morfológicas realizadas neste estudo foi qualitativa, observou-se a presença ou ausência de fusão dentinária e o fechamento dos túbulos

dentinários nas amostras irradiadas pelo laser de diodo.

As alterações morfológicas da dentina promovidas pela irradiação laser variam de acordo com o comprimento de onda do laser, parâmetros e condições de irradiação. Os lasers de Er:YAG e Er; Cr:YSGG geralmente promovem remoção de debris e *smear layer* e abertura dos túbulos dentinários. No entanto, o padrão morfológico poderá ser modificado e regiões fusionadas ou carbonizadas observadas, de acordo com a energia empregada, o tempo de irradiação, a configuração geométrica da extremidade da fibra óptica, a condição de refrigeração (29, 30, 36,37,38,39,40).

Os resultados apurados com o lasers Nd:YAG, descritos na literatura, relatam a presença de túbulos dentinários obliterados pelo tecido fusionado durante a irradiação do canal (41,42,43). As micrografias de amostras irradiadas neste estudo com o laser de diodo indicam obliteração dos túbulos dentinários na região apical sugerindo fusão da dentina, conforme exposto na literatura (113). Comportamento morfológico distinto foi observado na região média, onde os túbulos dentinários permaneceram abertos e os sinais de fusão da dentina foram discretos, como relatado na literatura (33).

O comportamento heterogêneo das alterações morfológicas ao longo do canal radicular observado neste estudo parece ter sido influenciado pela disposição não perpendicular da porção distal da fibra às paredes do canal (45, 46).

A emissão da radiação laser pela fibra óptica, utilizada neste estudo, ocorreu na sua porção distal. Embora neste estudo a propagação do feixe fosse divergente, não houve nenhuma emissão lateral de fótons na fibra. As diferenças morfológicas notadas entre as regiões apical e média numa mesma amostras podem ser justificadas pela distância entre a fibra e as paredes dentinárias (44). Na região média os túbulos permaneceram abertos pelo menor contato da ponta da fibra com as paredes dentinárias, dada a maior largura do canal nessa região e a disposição paralela da fibra com relação às paredes do canal. Por outro lado,

na região apical, o menor diâmetro do canal possibilitou o contato da porção distal da fibra com as paredes dentinárias e concentração da energia naquela região, beneficiando a fusão da dentina e obliteração dos túbulos.

Recentemente foi desenvolvida uma nova fibra endodôntica (RCLase; Lumenis; Opus Dent; Israel), cuja configuração em espiral permite a emissão lateral da energia durante a irradiação intracanal (1). Até o presente momento, essas fibras só estão disponíveis para o laser de Er:YAG. O uso de fibras com essa configuração geométrica permite a irradiação do canal de forma mais homogênea.

O padrão morfológico das amostras do grupo controle exibiu túbulos dentinários abertos devido à ação da solução de EDTA, especialmente na região média. Esse comportamento justifica-se pela melhor ação de limpeza promovida pelo EDTA nos terços médio e cervical do que no terço apical, notando-se uma redução do número de túbulos dentinários abertos nesse sentido, conforme descrito na literatura (53,54,55).

6.3 Avaliação da infiltração marginal apical

A investigação da infiltração no canal radicular é um assunto complexo que compreende a avaliação de muitas variáveis, como técnica de obturação, propriedades físicas e químicas dos materiais obturadores, a presença ou ausência do *smear layer*. A respeito desta última, vários autores afirmaram que a remoção da camada de *smear layer* das paredes do canal radicular, previamente à obturação, beneficia o selamento apical promovido pelos cimentos endodônticos reduzindo os níveis de infiltração (49, 50, 57, 58).

A avaliação da capacidade de selamento dos materiais obturadores endodônticos pode

ser medida por diferentes métodos de análise, como penetração de corantes, bactérias, marcadores radioativos, métodos eletroquímicos e computadorizados de filtração de fluidos. O método de infiltração de corante demonstra simplicidade, facilidade de execução e baixo custo, embora apresente desvantagens como a destruição da amostra e a avaliação semiquantitativa, não informando a penetração volumétrica do corante, aspecto porém calculável (58, 114).

Neste estudo foi testada a qualidade de selamento marginal apical promovida por três diferentes cimentos endodônticos (AH Plus, N-Rickert e Apexit), quando a camada de *smear layer* foi removida pela ação da solução de EDTA no grupo controle ou quando as características morfológicas da dentina foram modificadas pela irradiação do laser de diodo no grupo experimental.

O menor índice de infiltração linear mensurado neste estudo no grupo controle foi encontrado nas amostras cimentadas pelo N-Rickert, seguido dos cimentos AH Plus e Apexit, nesta ordem. Contudo, não foram constatadas diferenças significativas entre a capacidade de selamento dos cimentos no grupo controle.

Estudos publicados também não constataram diferenças significativas entre os índices de infiltração de cimentos obturadores quando as paredes dentinárias sofreram a ação de agentes quelantes (56, 57). Vale ressaltar que esses estudos avaliaram, além dos cimentos mencionados acima, outras marcas comerciais, e avaliaram a capacidade de selamento por outros métodos, que não a infiltração linear do corante pelo forame apical.

O índice médio de infiltração do AH Plus no grupo controle deste estudo ($1,50 \pm 1,87$ mm) foi próximo ao constatado quando a camada de *smear layer* foi removida pela ação do Na-EDTA a 15 % ($2,54 \pm 0,84$) (65). O bom selamento do cimento AH Plus às paredes dentinárias tratadas previamente pela ação de agentes quelantes pode ser justificado pela remoção prévia da camada de *smear layer*, embora diferentes soluções quelantes tenham sido

utilizadas (59).

A remoção do *smear layer* e conseqüente abertura da entrada dos túbulos dentinários, quer pela ação do EDTA quer pela ação da irradiação do laser Er:YAG, prejudicaram o selamento do cimento Sealapex, representante do grupo de cimentos à base de hidróxido de cálcio (63). No presente experimento também se observou no grupo controle, cuja camada de *smear layer* foi removida pela ação do EDTA-T a 17%, maior índice de infiltração marginal apical para o cimento Apexit. No entanto, num outro estudo não foi observada diferença significativa entre os níveis de infiltração promovidos pelos cimentos AH Plus e Apexit, quando a camada de *smear layer* foi removida pela ação da solução de EDTA, conforme apontam os nossos resultados (56).

A média de infiltração do cimento N-Rickert mensurada neste estudo ($0,74 \pm 0,82$ mm) foi maior do que os valores publicados anteriormente na literatura, $0,29 \pm 0,30$ mm (58, 63). A imersão das amostras 48 horas após a conclusão da obturação permitiu que a presa do cimento estivesse consolidada ou avançada antes do contato com o corante, certamente minimizando os índices de infiltração (58). Já os maiores índices das amostras imersas imediatamente após a obturação, reprodução experimental mais próxima à situação clínica, podem ser justificados pela ausência de presa completa do cimento, como sugerem os resultados deste estudo e outros publicados (63). A diferença entre os resultados dos estudos de imersão imediata pode ser relacionada às variações na proporção pó/líquido utilizadas e conseqüente interferência no escoamento do cimento, uma vez que não existe proporção exata indicada pelo fabricante.

No grupo laser os índices de infiltração dos cimentos AH Plus e Apexit reduziram, quando comparados aos seus respectivos controles. O índice de infiltração do cimento N-Rickert praticamente não alterou quando o canal foi irradiado pelo laser de diodo. No grupo laser não foi observada diferença significativa entre os índices de infiltração dos cimentos

avaliados. A avaliação estatística só indicou diferença significativa entre os grupos controle e laser quando os canais foram obturados pelo cimento Apexit.

A remoção da camada de *smear layer* não é o único fator determinante na qualidade do selamento marginal apical, assim como o padrão morfológico da dentina na região apical, principalmente quando o canal radicular é irradiado. Este fato foi evidenciado pelos reduzidos índices de infiltração de amostras irradiadas pelo laser Nd:YAG, Er:YAG e argônio, nesta ordem (64). A fusão da dentina reduz a permeabilidade dentinária e assim minimiza os índices de infiltração marginal.

Os estudos que avaliaram a capacidade de selamento dos cimentos endodônticos às paredes dentinárias irradiadas com lasers de diodo ou Nd:YAG, cujos comprimentos de onda estão no infravermelho próximo, observaram que os menores índices de infiltração foram relacionados à estrutura dentinária irradiada do que àquela tratada com agente quelante, independente dos cimentos endodônticos testados (AH Plus, Endofill, Endo REZ) (65, 66).

A concordância dos resultados exibidos com os demais autores permite aceitar como válido o fato da remoção mais efetiva da camada de *smear layer* pela irradiação laser melhorando o selamento marginal apical. Parece lícito considerar o padrão morfológico da dentina irradiada como aspecto relevante aos níveis de infiltração para alguns tipos de cimentos, já que o fechamento das aberturas dos túbulos dentinários beneficiou o selamento apical das amostras obturadas pelo cimento Apexit, enquanto o mesmo não foi observado nas amostras obturadas com AH Plus ou N-Rickert.

6.4 Efeitos da irradiação laser na redução da microbiota endodôntica

Este estudo avaliou os efeitos da terapia tradicional associada à irradiação laser para a redução da microbiota endodôntica, especificamente sobre microrganismos anaeróbios viáveis, *Enterococcus* e *Lactobacillus*, nos casos de infecção endodôntica primária.

As técnicas de cultura permitiram detectar nos 23 sítios investigados a presença de anaeróbios viáveis no início do tratamento, confirmando microbiologicamente o processo infeccioso, uma vez que esses microrganismos são os principais endopatógenos associados às infecções endodônticas (71,72,73).

As terapêuticas antimicrobianas realizadas neste estudo promoveram a redução da população microbiana ao longo do tratamento endodôntico nos grupos controle e laser, embora não tivesse sido observada a erradicação da microbiota. No grupo controle, quatro sítios (28,6 %) mostraram-se positivos à presença dos microrganismos anaeróbios ao final do tratamento, enquanto um sítio foi positivo no grupo laser de acordo com a metodologia empregada. Este fato sugere eficiência parcial das manobras antimicrobianas realizadas durante o preparo químico cirúrgico, em ambos os grupos, mas principalmente no grupo controle. Não existiu relação entre o nível inicial de microrganismos infectantes (coleta 01) e o número de organismos detectados ao final do tratamento químico-cirúrgico (coleta 04), sugerindo que o efeito do preparo químico-cirúrgico depende não somente da carga microbiana, mas da sua resistência aos agentes antimicrobianos empregados e da anatomia do sistema do canal radicular, influenciando o acesso dos agentes ao sítio de infecção.

Vários fatores podem interferir na efetividade dos agentes antimicrobianos durante o tratamento. A literatura aponta que a localização dos microrganismos em regiões íntimas dos túbulos dentinários, delta apical e canais secundários favorece a sua sobrevivência nessas

regiões pelo acesso restrito das soluções irrigadoras (90, 91). Na tentativa de minimizar essa condição, a instrumentação dos dentes tratados neste estudo procurou ampliar a região apical pelo uso de instrumentos de maior diâmetro (nº 45), propiciando a remoção de maior quantidade de dentina infectada e favorecendo irrigação mais efetiva nessa região de difícil acesso à solução irrigadora.

Soma-se o fato de as bactérias gram-positivas, especialmente as facultativas, exibirem baixa atividade metabólica por um longo período de tempo mesmo em condições adversas, demonstrando crescente resistência aos procedimentos antimicrobianos realizados durante a terapêutica endodôntica. Fatores como infiltração coronária, durante ou após o tratamento endodôntico, podem modificar as condições nutricionais daquele ecossistema e contribuir para o crescimento dos microrganismos no interior do canal radicular (76).

O sucesso do tratamento endodôntico está subordinado ao cumprimento dos postulados endodônticos, entre eles a eliminação dos microrganismos que ao acaso colonizam o complexo dentina/polpa. As limitações dos aspectos mencionados acima podem influenciar no êxito do tratamento, determinando variabilidade no sucesso da terapia endodôntica (67,68,69).

O efeito antimicrobiano das soluções químicas e da irradiação com o laser de diodo mostrou-se efetivo quando avaliado *in vitro* em diversos estudos (7, 31, 35, 103,104,105). As condições dos microrganismos *in vitro*, em culturas planctônicas, por exemplo, são diferentes das condições observadas *in vivo*, sugerindo a importância da avaliação da efetividade dos agentes antimicrobianos *in vivo*.

O tempo de morte de uma espécie microbiana em um biofilme é numericamente maior do que quando consideramos a mesma espécie em uma cultura planctônica. Os microrganismos colonizadores no biofilme estão protegidos da ação do preparo químico-cirúrgico e de agentes bactericidas, desinfetantes e antibióticos, favorecendo o fracasso do

tratamento e a persistência de infecção (99). Os fatores que influenciam a susceptibilidade do biofilme a esses agentes são: espessura, idade, densidade celular, concentração da dose do agente antimicrobiano, composição e genótipo das bactérias do biofilme (100, 115). Ressalta-se assim a importância de experimentos que avaliem as propostas antimicrobianas em modelos experimentais que contemplem a reprodução do biofilme.

A eficiência do laser de diodo na redução da microbiota endodôntica foi investigada *in vivo* por um único estudo, que avaliou apenas a redução de estreptococos e estafilococos em canais radiculares infectados (102). Os canais irradiados demonstraram maior redução microbiana do que os do grupo controle, assim como demonstraram os resultados apurados neste estudo, que avaliou a ação antimicrobiana num espectro mais amplo, anaeróbios viáveis, *Enterococcus* e *Lactobacillus*.

O espectro de absorção da hidroxiapatita demonstra coeficientes similares na região de 800 nm a 1 μ m. Enquanto o coeficiente de absorção da água na região de comprimentos de onda em torno de 800 nm é inferior à região próxima a 1 μ m (116). O baixo coeficiente de absorção da água, um importante componente da dentina, por determinado comprimento de onda permite que os fótons penetrem em maior profundidade no tecido dentinário. Desta forma sugere-se que os comprimentos de onda próximos a 800 nm, como é o caso do laser de diodo utilizado neste estudo, possua maior capacidade bactericida do que aqueles centrados em 980 nm (104). Teoricamente, a capacidade antimicrobiana desses lasers alcançaria os microrganismos alojados em regiões profundas dos túbulos dentinários por irradiação direta ou por aquecimento, sendo, portanto, mais efetivos. Por outro lado, os lasers de maior comprimento de onda, especialmente acima de 2 μ m, possuem menor profundidade de penetração e maior deposição de energia nas camadas iniciais do tecido dentinário. Pode-se inferir que a quantidade de fótons disponíveis em camadas distantes da área irradiada é outro fator decisivo à efetividade dos lasers, pois a ação antimicrobiana é resultante dos efeitos

fototérmicos.

A análise dos resultados publicados mostra que o efeito bactericida do laser de diodo (830 nm) decresce com o aumento da espessura dentinária, sendo necessária maior potência de irradiação de forma que garanta a morte bacteriana em regiões com maiores espessuras de dentina (35, 103, 105). O porcentual de morte bacteriana em fatias de dentina com 500 µm, 1 mm e 2 mm de espessura infectadas por *S. mutans* pela irradiação com laser de diodo (7 W) reduziu de 97,7 % para 50,9 % e 20,1 %, nesta ordem (35).

O único sítio positivo aos anaeróbios viáveis no grupo laser ao final do tratamento correspondeu a um segundo pré-molar inferior, cuja maior espessura da raiz e possível colonização deste sítio por alguma espécie mais resistente poderiam justificar a menor ação dos lasers nesse caso. Deve-se ressaltar, no entanto, que a microbiota endodôntica pode ser bastante complexa, incluindo microrganismos não cultiváveis (80,81,82), portanto não detectáveis pela metodologia utilizada.

Apesar de organismos do gênero *Lactobacillus* não serem considerados endopatógenos, a sua presença em dentes portadores de necrose pulpar indica elevado potencial de sobrevivência em ambientes com restrições de suprimentos energéticos. A prevalência desse microrganismo, 8,7 %, no total dos casos avaliados neste estudo foi reduzida diante dos valores apontados pela literatura (41,3%) (76). No entanto, deve ser considerado que os dentes com polpa necrosada já haviam sido manipulados em uma ou mais sessões antes da coleta e todos apresentavam lesão periapical (76). A frequência da espécie *L.acidophilus* é indicada pela literatura em índices aproximados de 4, 2 % (73, 117).

E. faecalis é mais prevalente em casos de dentes com insucesso do tratamento endodôntico portadores de lesões periapicais, enquanto os casos de dentes com lesões primárias possuem menor frequência (73, 88, 89). A sua permanência após os procedimentos químicos-cirúrgicos próprios da terapêutica endodôntica representa um risco ao fracasso do

tratamento. De acordo com a avaliação dos casos de infecções primárias por técnicas de cultura a prevalência do *E. faecalis* assume valores discretos (0,5-7 %), enquanto as técnicas moleculares sinalizam maior prevalência; 14 % por PCR (73, 74, 79, 87).

Este estudo não usou a determinação por cultura da espécie *E. faecalis* nos 23 sítios avaliados, mas o gênero *Enterococcus* cuja prevalência foi de 17,4 %; índice superior ao indicado na literatura para a espécie (3,2 %, 4,0 %, 5 %, 6,3 %) (73, 76, 86, 95). Vale ressaltar, no entanto, que a maioria dos estudos que detectaram *E. faecalis* em canais radiculares infectados não utilizou meio seletivo, como foi empregado no presente estudo, o qual favorece a detecção desses microrganismos (73, 76).

Além disso, a maior ocorrência pode estar relacionada a outras espécies que não apenas *E. faecalis*. Por outro lado, a prevalência de *E. faecalis* detectada por PCR, 26 %, foi mais elevada do que indicado na literatura em infecções primárias (73, 74, 79, 87), contudo inferior ao índice de 82% apontado por outro estudo (86).

A presença de cárie ou falhas no selamento coronário nos casos de infecção primária pode justificar a elevada ocorrência de *E. faecalis*, já que a via coronária é uma das vias de entrada ao espaço endodôntico (86).

A menor prevalência do microrganismo no grupo laser, coleta 01, prejudicou uma avaliação mais precisa quanto ao real potencial da ação antimicrobiana do laser numa situação clínica. Os dois casos positivos detectados por PCR no grupo laser no início do tratamento demonstraram resultado negativo no final do tratamento, sugerindo a eliminação do microrganismo.

No grupo controle observou-se a maior prevalência do *E. faecalis* (n = 4) medida pelo PCR. A terapêutica implementada nesse grupo não foi capaz de eliminar o microrganismo, pois dos quatro sítios positivos na Coleta 01, dois sítios (C4 e C5) mantiveram-se positivos ao final do tratamento. A técnica de cultura não detectou a presença do *Enterococcus* nos sítios

C4 e C5, certamente pela reduzida quantidade do microrganismo.

Embora alguns estudos demonstrem significativos índices de discordância entre as técnicas de cultura e PCR, os resultados apurados neste estudo exibiram maior número de resultados concordes do que discordantes. Justificam-se os resultados positivos para cultura e negativos para PCR, em virtude de a primeira técnica identificar o gênero *Enterococcus* e a segunda, a espécie *E. faecalis*. No gênero *Enterococcus* encontram-se outras espécies além do *E. faecalis*, e possivelmente uma delas foi a responsável pela cultura positiva. Por outro lado, os resultados cultura negativa e PCR positivo são esperados devido à maior sensibilidade da técnica de PCR.

Apesar da maior sensibilidade do PCR (10^1 a 10^2 células) às técnicas de cultura que utilizam meios não seletivos (aproximadamente 10^4 a 10^5 células), a técnica molecular não permite a quantificação das bactérias identificadas (86). Não apenas a identificação como a quantificação dos microrganismos são importantes aspectos para caracterização dos diferentes tipos de infecção endodônticas.

A incompleta eliminação do *Enterococcus* sugere maior resistência desta espécie à terapia endodôntica tradicional do que os anaeróbios viáveis, pois a proporção deste gênero em relação aos anaeróbios viáveis foi maior no final do tratamento do que no início.

A solução de NaOCl, principal solução de irrigação, e o hidróxido de cálcio não foram capazes de eliminar *E. faecalis*. Estudos clínicos e laboratoriais demonstraram não haver diferença significativa no efeito bactericida da solução de NaOCl nas várias concentrações (0,5; 1,0; 2,5; 5,25; 6,0 %) no canal radicular (92). Contudo, o uso de soluções de NaOCl a 0,5 %, 2,5 % e 5 % demonstrou diferença significativa quando o percentual de redução bacteriana foi avaliado em amostras de dentina infectada por *E. faecalis*, sendo a concentração de 0,5 % a menos efetiva (91). Para minimizar o rápido decréscimo do efeito bactericida das soluções NaOCl em baixa concentração, foi sugerida a irrigação dessa solução

em maiores volumes e frequência, de forma que a renovasse compensando a baixa concentração (90).

A ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio depende de vários fatores: da difusão dos íons hidroxila em concentração adequada, tempo de permanência, presença de exsudato e *smear layer* (91, 68). Embora a solução de hidróxido de cálcio em água (10 %) mostre-se efetiva na redução das unidades formadoras de colônias do *E. faecalis*, o seu porcentual de redução varia de 89 a 94 % (97). Além disso, certas espécies bacterianas, como *E. faecalis*, e fungos sobrevivem ao meio alcalino proporcionado pela medicação (92).

6.5 Considerações finais e perspectivas futuras

Os resultados deste estudo demonstraram, nas condições experimentais investigadas, que o laser de diodo pode ser incorporado à rotina endodôntica sem prejuízos biológicos às estruturas circunvizinhas causados pelo aumento de temperatura. Ressalta-se, no entanto, que esta tecnologia deve sempre ser associada às condutas endodônticas resguardando todos os cuidados técnicos descritos e respeitando os postulados da Endodontia.

Os benefícios biológicos, redução da infiltração marginal apical e da microbiota endodôntica, foram estatisticamente similares aos resultados alcançados pelas manobras da terapêutica tradicional no grupo controle.

Outros estudos complementares, como teste de adesão, devem investigar o comportamento dos cimentos endodônticos na superfície irradiada pelo laser de forma a justificar e melhor compreender a qualidade do selamento marginal apical observados.

Alguns questionamentos devem ser considerados após as avaliações realizadas neste estudo. A irradiação do canal radicular após o PQC na primeira consulta promove o selamento da abertura dos túbulos dentinários na região apical. Este fato poderia determinar o

aprisionamento de microrganismos viáveis, que não sofreram a ação fototérmica da irradiação laser, em regiões distantes nos túbulos dentinários. Nesta condição de isolamento, esses microrganismos não mais sofreriam a ação dos agentes antimicrobianos, como NaOCl e hidróxido de cálcio, uma vez que a principal via de acesso dessas substâncias, a abertura dos túbulos dentinários, mostra-se selada. Deve-se ponderar, no entanto, que nessa condição de localização dificilmente os agentes antimicrobianos teriam o contato necessário para efetivar a sua ação mesmo em canais não irradiados. Por outro lado, a integridade do cimento radicular minimizaria o risco de infecção do espaço periodontal por esses microrganismos, que talvez ficassem confinados em equilíbrio biológico .

Os resultados demonstraram redução significativa no número de UFC de anaeróbios viáveis por amostra no grupo controle já na primeira consulta, após a execução do preparo químico-cirúrgico, demonstrando a sua eficiência. Este resultado nos permite questionar a relevância da irradiação do canal radicular na primeira consulta. Soma-se a esta observação e aos aspectos discutidos no parágrafo anterior o fato de não ter sido observada redução significativa no número de microrganismos entre as segunda e terceira consultas em ambos os grupos. Logo, pode-se sugerir nos casos de infecção primária que a irradiação do canal radicular com laser de diodo seja realizada apenas antes da obturação.

O real efeito aditivo da associação da irradiação com laser à terapêutica tradicional nos casos de infecção primária somente poderá ser avaliado por estudo longitudinal, permitindo comparar os índices de sucesso e fracasso alcançados quando confrontados com os índices da terapêutica tradicional não associada ao laser.

O mais importante fundamento deste novo campo de pesquisa refere-se à posição soberana da formação clínica do cirurgião dentista e do endodontista. As novas tecnologias devem ser sempre consideradas como vetores facilitadores e nunca substitutos da experiência e preceitos clínicos.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo permitiram avaliar os parâmetros físicos e biológicos do uso do laser de diodo no tratamento endodôntico, concluindo-se de acordo com as condições testadas que:

7.1 o aumento de temperatura na superfície radicular externa durante a irradiação do canal radicular com laser de diodo nos regimes de emissão contínuo e pulsado não excedeu o limite crítico de 10 °C, assumido como referência, desde que o intervalo de tempo entre os ciclos de irradiação seja de 20 segundos;

7.2 a irradiação do canal radicular pelo laser de diodo promoveu a obliteração da entrada dos túbulos dentinários, sugerindo fusão da dentina, majoritariamente no terço apical das amostras irradiadas;

7.3 a irradiação do canal radicular pelo laser de diodo no regime de emissão contínuo reduziu o grau de infiltração marginal apical apenas nos canais radiculares obturados pelo cimento Apexit, o mesmo não sendo observado quando os cimentos N-Rickert e AH Plus foram utilizados;

7.4 o potencial de redução dos microrganismos anaeróbios viáveis no grupo laser foi maior que no grupo controle, embora não tivesse sido constatada diferença significativa entre os grupos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

1. Stabholz A, Sahar-Helft S, Moshonov J. Lasers in endodontics. *Dent Clin North Am* 2004;48(4):809-32.
2. Kimura Y, Wilder-Smith P, Matsumoto K. Lasers in endodontics: a review. *Int Endod J* 2000;33:173-85.
3. Matsumoto K. Lasers in endodontics. *Dent Clin North Am* 2000;44(4):889-906.
4. Gouw-Soares S, Lage-Marques JL, Zezell DM, Groth EB, Eduardo CP. Comparative study of dentine permeability after apicectomy and surface treatment with 9.6 microm TEA CO2 and Er:YAG laser irradiation. *J Clin Laser Med Surg* 2004 Apr;22(2):129-39.
5. Gekelman D, Prokopowitsch I, Eduardo CP. In vitro study of the effects of Nd:YAG laser irradiation on the apical sealing of endodontic fillings performed with and without dentin plugs. *J Clin Laser Med Surg* 2002 Jun;20(3):117-21.
6. Schoop U, Kluger W, Moritz A, Nedjelic N, Georgopoulos A, Sperr W. Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin. *Lasers Surg Med* 2004;35(2):111-6.
7. 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* 1997 Mar;28(3):205-9.
8. Moritz A, Doertbudak O, Gutknecht N, Goharkhay K, Schoop U, Sperr W. Nd:YAG laser irradiation of infected root canals in combination with microbiological examinations. *J Am Dent Assoc* 1997 Nov;128(11):1525-30.
9. Gutknecht N, Nuebler-Moritz M, Burghardt SF, Lampert F. The efficiency of root canal disinfection using a holmium:yttrium-aluminum-garnet laser in vitro. *J Clin Laser Med Surg* 1997;15(2):75-8.

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

10. Bergmans L, Moisiadis P, Teughels W, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Bactericidal effect of Nd:YAG laser irradiation on some endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J* 2006;39(7):547-57.
11. Weichmann G, Johnson J. Laser use in endodontics. A preliminary investigation *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1971;31:416-20.
12. Weichmann G, Johnson J, Nitta L. Laser use in endodontics. Part II. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1972;34:828-30.
13. Romanos G, Nentwig GH. Diode laser (980 nm) in oral and maxillofacial surgical procedures: clinical observations based on clinical applications *J Clin Laser Med Surg* 1999;17(5):193-97.
14. Moritz A, Schoop U, Goharkhay K, Schauer P, Doertbudak O, Wernisch J, et al. Treatment of periodontal pockets with a diode laser. *Lasers Surg Med* 1998;22:302-11.
15. Moritz A, Gutknecht N, Doertbudak O, Goharkhay K, Schoop U, Schauer P, et al. Bacterial reduction in periodontal pockets through irradiation with a diode laser: a pilot study. *J Clin Laser Med Surg* 1997;15:33-7.
16. Kreisler M, Al Haj H, Daublander M, Gotz H, Duschner H, Willershausen B, et al. Effect of diode laser irradiation on root surfaces in vitro. *J Clin Laser Med Surg* 2002;20:63-9.
17. Schwarz F, Sculean A, Berakdar M, Szathmari L, Gerog T, Becker J. In vivo and in vitro effects of an Er:YAG laser, a GaAlAs diode laser, and scaling and root planing on periodontally diseased root surfaces: a comparative histologic study. *Lasers Surg Med* 2003;32:359-66.
18. Katzir A. *Lasers and optical fibers in medicine*. San Diego: Academic Press, INC; 1993.
19. Niemz M. *Laser tissue interactions: fundamentals and applications*. Berlin: Springer; 1996.
20. Knappe V, Frank F, Rohde E. Principles of lasers and biophotonic effects. *Photomed Laser Surg* 2004;22(5):411-7.
21. Featherstone JD, Fried D. Fundamental interactions of lasers with dental hard tissues. *Med Laser Appl* 2001;16:181-94.

22. Eriksson A, Albrektsson T, Grane B, McQueen D. Thermal injury to bone. A vital-microscopic description of heat effects. *Int J Oral Surg* 1982;11(2):115-21.
23. Eriksson AR, Albrektsson T. Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent* 1983;50(1):101-7.
24. Cohen BI, Deutsch AS, Musikant BL, Pagnillo MK. Effect of power settings versus temperature change at the root surface when using multiple fiber sizes with a Holmium YAG laser while enlarging a root canal. *J Endod* 1998;24(12):802-6.
25. Deutsch AS, Cohen BI, Musikant BL. Temperature change at the root surface when enlarging a root canal with a holmium: YAG (Ho:YAG) laser, using six different fiber-optic sizes. *Gen Dent* 2004;52(3):222-7.
26. Cohen BI, Deutsch AS, Musikant BL. Effect of power settings on temperature change at the root surface when using a holmium YAG laser in enlarging the root canal. *J Endod* 1996;22(11):256-9.
27. Kimura Y, Yonaga K, Yokoyama K, Kinoshita J, Ogata Y, Matsumoto K. Root surface temperature increase during Er:YAG laser irradiation of root canals. *J Endod* 2002;28(2):76-8.
28. Lee BS, Jeng JH, Lin CP, Shoji S, Lan WH. Thermal effect and morphological changes induced by Er:YAG laser with two kinds of fiber tips to enlarge the root canals. *Photomed Laser Surg* 2004;22(3):191-7.
29. Yamazaki R, Goya C, Yu DG, Kimura Y, Matsumoto K. Effects of erbium,chromium:YSGG laser irradiation on root canal walls: a scanning electron microscopic and thermographic study. *J Endod* 2001;27(1):9-12.
30. Ishizaki NT, Matsumoto K, Kimura Y, Wang X, Kinoshita J, Okano SM, et al. Thermographical and morphological studies of Er,Cr:YSGG laser irradiation on root canal walls. *Photomed Laser Surg* 2004;22(4):291-7.
31. Kreisler M, Kohnen W, Beck M, Al Haj H, Christoffer A, Götz H, et al. Efficacy of NaOCl/H₂O₂ irrigation and GaAlAs laser in decontamination of root canals in vitro. *Lasers Surg Med* 2003;32:189-96.
32. Gutknecht N, Franzen R, Meister J, Vanweersch L, Mir M. Temperature evolution on human teeth root surface after diode laser assisted endodontic treatment. *Lasers Med Sci* 2005;20(2):99-103.

33. Wang X, Sun Y, Kimura Y, Kinoshita J, Ishizaki NT, Masumoto K. Effects of diode laser irradiation on smear layer removal from root canal walls and apical leakage after obturation. *Photomed Laser Surg* 2005;23(6):575-81.
34. Schoop U, Kluger W, Dervisbegovic S, Goharkhay K, Wernisch J, Georgopoulos A, et al. Innovative wavelenghts in endodontic treatment. *Lasers Surg Med* 2006;38:624-30.
35. Lee BS, Lin YW, Chia JS, Hsieh TT, Chen MH, Lin CP, et al. Bactericidal effects of diode laser on *Streptococcus mutans* after irradiation through different thickness of dentin. *Lasers Surg Med* 2006;38:62-9.
36. Hossain M, Nakamura Y, Yamada Y, Kimura Y, Masumoto N, Masumoto K. Effects of Er;Cr:YSGG laser irradiation in human enamel and dentin: ablation and morphological studies. *J Clin Laser Med Surg* 1999;17(4):155-59.
37. Altundasar E, Özçelik B, Cehreli ZC, Masumoto K. Ultramorphological and histochemical changes after Er;Cr:YSGG laser irradiation and two different irrigation regimes. *J Endod* 2006;32(5):465-8.
38. Ali MN, Hossain M, Nakamura Y, Matsuoka E, Kinoshita J, Masumoto K. Efficacy of root canal preparation by Er;Cr:YSGG laser irradiation with crown-down technique *in vitro*. *Photomed Laser Surg* 2005;23(2):196-201.
39. Takeda FH, Harashima T, Eto JN, Matsumoto K. Effect of Er:YAG laser treatmet on the root canal walls of human teeth: an SEM study. *Endod Dent Traumatol* 1998;14:270-3.
40. Oliveira RG, Gouw-Soares S, Baldochi SL, Eduardo CP. Scanning electron microscopy (SEM) and optical microscopy: effects of Er:YAG and Nd:YAG lasers on apical seals after apicectomy and retrofill. *Photomed Laser Surg* 2004;22(6):533-6.
41. Lage-Marques JL. Avaliação dos efeitos da irradiação laser, utilizando Nd:YAG e CO₂ e argônio no selamento dentinário e marginal de obturações retrógradas [Tese de Livre Docência]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1997.
42. Lage-Marques JL, Eduardo CP, Matsumoto K. A study on morphological changes of the root canal walls lased by pulsed Nd:YAG laser. *J Jpn Endodon Assoc* 1995;16:64-9.
43. Depraet FJ, De Bruyne MA, De Moor RJ. The sealing ability of an epoxy resin root canal sealer after Nd:YAG laser irradiation of the canal. *Int Endod J* 2005;38:302-5.

44. Anic I, Tachibana H, Masumoto K, Qi P. Permeability, morphologic and temperature changes of canal dentine walls induced by Nd: YAG, CO₂ and argon lasers. *Int Endod J* 1996;29(1):13-22.
45. Santos C, Sousa-Neto MD, Alfredo E, Zanello Guerisoli DM, Pecora JD, Comelli Lia RF. Morphologic evaluation of the radicular dentine irradiated with Nd:YAG laser under different parameters and angles of incidence *Photomed Laser Surg* 2005;23(6):590-5.
46. Camargo SE, Valera MC, Camargo CH, Fonseca MB, Menezes MM. Effects of Nd:YAG laser irradiation on root canal dentin wall: a scanning electron microscopic study. *Photomed Laser Surg* 2005;23(4):399-404.
47. Laghios CD, Cutler CW, Gutmann JL. *In vitro* evidence that lipopolysaccharide of and oral pathogen leaks from root-end filled teeth. *Int Endod J* 2000;33:333-9.
48. Mader CL, Baumgartner JC, Peters DD. Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on the root canal walls. *J Endod* 1984;10(477-83).
49. Torabinejad M, Handysides R, Ali Khademi A, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:658-66.
50. Hulsmann M, Heckendorff M, Lennon Á. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J* 2003;36:810-30.
51. Seidberg B, Schilder H. An evaluation of EDTA in endodontics *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974;37:609-20.
52. Çalt S, Serper A. Time dependent effects of EDTA on dentin structures *J Endod* 2002;28:17-9.
53. Scelza M, Antoniazzi JH, Scelza P. Efficacy of final irrigation - a scanning electron microscopic evaluation. *J Endod* 2000;26:355-8.
54. Hulsmann M, Heckendorff M. Comparative evaluation of three chelator pastes. *Int Endod J* 2002;35:668-79.
55. Lim T, Wee T, Choi M, Koh W, Sae-Lim V. Light and scanning electron microscopic evaluation of Glyde™ File Prep in smear layer removal. *Int Endod J* 2003;36:336-43.

56. Miletic I, Anic I, Pezelij-Ribaric S, Jukic S. Leakage of five root canal sealers. *Int Endod J* 1999;32:415-8.
57. Çobankara FK, Adanir N, Belli SB. Evaluation of the influence of smear layer on the apical and coronal sealing ability of toe sealers *J Endod* 2004;30(6):406-9.
58. Sousa-Neto MD, Passarinho-Neto JG, Carvalho-Júnior JR, Cruz-Filho AM, Pécora JD, Saquy PC. Evaluation of the EDTA, EGTA and CDTA on dentin adhesiveness and microleakage with different root canal sealers. *Braz Dent J* 2002;13(2):123-28.
59. Mitic A, Mitic N, Tosic G. Apical leakage of root canal system obturation materials. *Stom Glas S* 2005;52:90-6.
60. Cobankara FK, Orucoglu H, Sengun A, Belli SB. The quantitative evaluation of the apical sealing of four endodontic sealers. *J Endod* 2006;32(1):66-8.
61. Brugnera Jr A, Zanin F, Barbin EL, Spanó JC, Santana R, Pécora JD. Effects of Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on radicular dentine permeability using different irrigant solutions. *Lasers Surg Med* 2003;33:256-9.
62. Pecora JD, Brugnera Jr A, Cussioli AL, Zanin F, Silva R. Evaluation of dentin root canal permeability after instrumentation and Er:YAG laser application. *Lasers Surg Med* 2000;26:277-81.
63. Mello I, Robazza CR, Antoniazzi JH. Influence of Er:YAG laser irradiation on apical sealing of four different sealers *Braz Dent J* 2004;15(3):190-3.
64. Kimura Y, Yamazaki R, Goya C, Tomita Y, Yokoyama K, Matsumoto K. A comparative study on the effects of three types of laser irradiation at the apical stop and apical leakage after obturation. *J Clin Laser Med Surg* 1999;17(6):261-6.
65. Bassili LO, Moraes IG, Zanetti RV. Infiltração apical em obturações de canais realizadas após aplicação do laser Nd:YAG ou solução de EDTA nas paredes do canal radicular. *J Appl Oral Sci* 2003;11(2):102-6.
66. Carvalho CF. Influência da irradiação ou não com diferentes tipos de lasers na permeabilidade marginal apical de dois cimentos endodônticos AH Plus e Endo REZ [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.
67. Benenati FW, Khajotia SS. A radiographic recall evaluation of 894 endodontic cases treated in a dental school setting. *J Endod* 2002;28(5):391-5.

68. De Quadros I, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Evaluation of endodontic treatments performed by students in a Brazilian Dental School. *J Dent Educ* 2005;69(10):1161-70.
69. Tamarut T, Kovacevic M, Glavicic S. Influence of the length of instrumentation and canal obturation on the success of endodontic therapy. A 10-year clinical follow-up. *Am J Dent* 2006;19(4):211-6.
70. Siqueira Jr. JF, Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod* 2005 Jun;31(6):411-23.
71. Sundqvist G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora - review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1997;78:522-30.
72. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7:257-62.
73. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19(2):71-6.
74. Siqueira Jr. JF, Rocas IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Actinomyces species, streptococci, and Enterococcus faecalis in primary root canal infections. *J Endod* 2002 Mar;28(3):168-72.
75. Siqueira Jr. JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004 May;97(5):632-41.
76. Chávez de Paz LE, Dahlén G, Molander A, Moller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontics treatment. *Int Endod J* 2003;36:500-8.
77. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2001 Sep;39(9):3282-9.
78. Siqueira Jr. JF, Rocas IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97(1):85-94.

79. Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod* 2006 Aug;32(8):715-21.
80. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43(11):5721-32.
81. Saito D, Leonardo RT, Rodrigues JL, Tsai SM, Hofling JF, Goncalves RB. Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *J Med Microbiol* 2006 Jan;55(Pt 1):101-7.
82. Siqueira Jr. JF. Taxonomic changes of bacteria associated with endodontic infections. *J Endod* 2003;29:619-23.
83. Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod* 2006;32:104-9.
84. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population *J Endod* 2000;26:593-5.
85. Rocas IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira Jr. JF. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J Endod* 2004 Jul;30(7):504-8.
86. Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2006;102:247-53.
87. Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, et al. PCR-based identification of bacteria associated with endodontics infections. *J Clin Microbiol* 2002;40:3223-31.
88. Zoletti GO, Siqueira JF, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root filled teeth with or without periradicular lesions by culture dependent and independent approaches. *J Endod* 2006;32:722-6.
89. Rocas IN, Siqueira Jr. JF, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004 May;30(5):315-20.

90. Siqueira Jr. JF, Rocas IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5% and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod* 2000;26(6):331-4.
91. Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J* 2006;39:10-7.
92. Dunavant T, Regan JD, DentSc B, Glickman G, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006;32:527-31.
93. Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mancini MNG. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J* 2004;37:311-9.
94. Atlas R. Principles of Microbiology. 2nd ed. Dordrecht: WCB Publishers; 1997.
95. Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BK, Hamdan JS, et al. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol* 2001 Apr;16(2):100-5.
96. de Souza CA, Teles RP, Souto R, Chaves MA, Colombo AP. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiologic evaluation by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *J Endod* 2005 Feb;31(2):79-83.
97. Lynne RE, Liewehr FR, West LA, Patton WR, Buxton TB, McPherson JC. *In vitro* antimicrobial activity of various medication preparations on *E. faecalis* in root canal dentin. *J Endod* 2003;29:187-90.
98. Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. The susceptibility of starved, stationary phase and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. *J Endod* 2005;31:380-6.
99. Leonardo MR, Rossi MA, Silva LAB, Ito IY, Bonifácio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod* 2002;28(12):815-8.
100. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected

single-species biofilms. *Int Endod J* 2006;39:878-85.

101. 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* 1996;14(1):7-11.
102. Moritz A, Gutknecht N, Schoop U, Goharkhay K, Doertbudak O, Sperr W. Irradiation of infected root canals with a diode laser in vivo: results of microbiological examination. *Lasers Surg Med* 1997;21:221-6.
103. Gutknecht N, Gogswaardt V, Conrads G, Apel C, Schubert C, Lampert F. Diode laser radiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin. *J Clin Laser Med Surg* 2000;18:57-60.
104. Gutknecht N, Franzen R, Lampert F. Bactericidal effect of a 980 nm diode laser in the root canal wall dentin of bovine teeth *J Clin Laser Med Surg* 2004;22:9-13.
105. Schoop U, Kluger W, Moritz A, Nedjelic N, Georgopoulos A, Sperr W. Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin. *Lasers Surg Med* 2004;35:111-6.
106. Radaelli CM, Zezell DM, Cai S, Antunes A, Gouw-Soares S. Effect of a high power diode laser irradiation in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. "In vitro" study. *International Society of Lasers in Dentistry*; 2003: Elsevier Science B.V.; 2003. p. 273-6.
107. Siqueira Jr. JF, Rocas IN. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radicidentis* in primary and persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96(2):215-22.
108. Fowles GR. *Introduction to modern optics*. 2nd ed. New York: Holt Rinehartand Winton; 1968.
109. Mc Cullagh JJ, Setchell DJ, Gulabivala K, Hussey DL, Biagioni P, Lamey PJ, et al. A comparison of thermocouple and infrared thermographic analysis of temperature rise on the root surface during the continuous wave of condensation technique. *Int Endod J* 2000;33(4):326-32.
110. Moritz A, Schoop U, Klimscha J, Goharkhay K. Lasers in endodontics – a practical overview. *J Oral Laser Appl* 2004;4(3):159-66.
111. Stolf SF. Caracterização espectroscópica, térmica e estrutural de materiais de estrutura

dental [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - USP; 2003.

112. Saunders EM. In vivo findings associated with heat generation during thermomechanical compaction of gutta-percha. 1. Temperature levels at the external surface of the root. *Int Endod J* 1990;23(5):263-7.
113. Ribeiro AC, Calvo GE, Antoniazzi JH, Moritz A, Zezell DM. Thermal effects of diode laser during endodontic treatments. *Laser Zahnheilkunde* 2006;2:144.
114. Orucoglu H, Sengun A, Yilmaz N. Apical leakage of resin based root canal sealers with a new computerized fluid filtration meter. *J Endod* 2005;31(12):886-90.
115. Steward PS, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Biofilm antimicrobial resistance. In: Ghannoum M, O'Toole GA, editors. *Microbial Biofilms*. Washington: ASM Press; 2004. p. 425.
116. Maldonado EP, Ribeiro MS, Zezell DM. Interação da luz laser com tecidos biológicos. Apostila de curso. São Paulo: Mestrado Profissionalizante - IPEN - FOUASP; 2000.
117. Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2003 Oct;18(5):285-92.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 159/04

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, APROVOU o protocolo de pesquisa "*Efeitos do laser diodo (810nm) e do laser Er, Cr: YSGG (2.780nm) no tratamento endodôntico*", de responsabilidade da Pesquisadora **Adriana da Costa Ribeiro**, sob orientação da Profa. Dra. **Denise Maria Zzell**.

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, 06 de outubro de 2004

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

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**EFEITOS DO LASER DE DIODO (810nm) E DO LASER Er;Cr:YSGG (2.780nm)
NO TRATAMENTO ENDODÔNTICO**

Estas informações são para esclarecer suas dúvidas e pedir a sua participação como voluntário neste estudo, que tem como objetivo avaliar a ação do laser no tratamento de canal.

Os procedimentos para fazer o tratamento compreendem desde a anestesia do dente até a limpeza e a obturação do canal. O laser será utilizado para melhorar a condição de limpeza do canal.

Não existe risco extra na realização do tratamento do canal pelo uso do laser, além dos riscos comuns a qualquer tratamento, seja uma restauração ou uma extração. O laser não traz qualquer desconforto.

Você terá o benefício de fazer o tratamento de canal do seu dente, receber orientações para melhorar sua saúde bucal e ser encaminhado para as clínicas da faculdade para fazer outros tratamentos, sem qualquer gasto financeiro.

A qualquer momento, você poderá retirar o consentimento sem ter qualquer prejuízo no atendimento que vai receber.

O laser permite uma melhor limpeza do canal, matando bactérias que não são mortas pelos medicamentos que normalmente são usados no tratamento do canal. Eliminar um maior número de bactérias garante mais chances de sucesso ao tratamento.

Todas as informações obtidas não serão utilizadas para divulgar a sua identidade, que será mantida em sigilo. Os dados obtidos somente serão utilizados para este estudo.

A pesquisadora responsável, Dra. Adriana Ribeiro, poderá ser encontrada no Departamento de Endodontia desta Faculdade ou no telefone 9426 5240.

No caso de dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo).

“Após ler estas informações e de ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador concordo em participar de forma voluntária neste estudo.”

São Paulo, ___/___/___.

Nome: _____

Endereço: _____ Fone: _____

Documento de identificação: _____

(Assinatura do sujeito da pesquisa)