

Avaliação in vitro dos efeitos do laser de Nd:YAG na aderência de *Streptococcus mutans* em superfícies radiculares

Luana Marotta Reis de VASCONCELLOS^a, Raquel Guedes FERNANDES^a,
Cristiane Yumi KOGA ITO^b, Márcia Carneiro VALERA^c, Antonio Olavo Cardoso JORGE^b

^aPós-Graduanda em Biopatologia Bucal, nível Doutorado, Faculdade de Odontologia, UNESP, 12450-000 São José dos Campos - SP

^bDepartamento de Biociências e Diagnóstico Bucal - Faculdade de Odontologia, UNESP, 12450-000 São José dos Campos - SP

^cDepartamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, UNESP, 12450-000 São José dos Campos - SP

Vasconcellos LMR, Fernandes RG, Koga Ito CY, Valera MC, Jorge AOC. In vitro study of the adherence of *Streptococcus mutans* to root surface after Nd:YAG laser irradiation. Rev Odontol UNESP. 2006; 35(1): 1-5.

Resumo: A lesão de cárie radicular pode ser encontrada tanto em pacientes tratados periodontalmente, como em pacientes que não receberam esse tratamento. A presença de *Streptococcus mutans* pode ser considerada um indicador da atividade de cárie radicular e pode ocorrer com frequência após raspagem e alisamento radicular. O objetivo deste estudo foi avaliar in vitro a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície radicular de dentes bovinos previamente irradiados com laser Nd:YAG. Vinte e quatro corpos-de-prova foram preparados e divididos em três grupos de acordo com o tratamento recebido: 1) controle - sem tratamento; 2) irradiação com laser de Nd:YAG (200 mJ, 15 Hz e 30 W durante dez segundos); e 3) raspagem e alisamento radicular previamente à irradiação com laser Nd:YAG. Para o teste de aderência, os espécimes foram imersos em caldo infusão de cérebro e coração sacarosado, semeado com *Streptococcus mutans* GS-5, e mantidos por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação, foi realizada a semeadura em ágar infusão de cérebro e coração, e posteriormente foi quantificada a aderência por meio de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico ANOVA de Kruskal-Wallis e ao teste de Dunn. Os resultados mostraram, no Grupo 2, número significativamente mais elevado de células de *S. mutans* aderidas e o menor número no Grupo 3. O grupo controle exibiu valores intermediários. Concluiu-se que o uso do laser após a raspagem e o alisamento radicular diminuiu significativamente a aderência in vitro de *S. mutans* à superfície radicular de dentes bovinos.

Palavras-chave: Laser; *Streptococcus mutans*; raspagem radicular.

Abstract: Root caries may occur among patients submitted or not to periodontal therapy. The presence of *Streptococcus mutans* may be considered an indicator of root caries activity and it can be frequently isolated after scaling and root planning. The aim of this study was to evaluate in vitro the adherence of *Streptococcus mutans* to the root surface of bovine teeth after laser Nd:YAG irradiation. Twenty-four specimens were prepared and were divided into three groups according to the treatment: 1) control – no treatment; 2) Nd:YAG laser irradiation (200 mJ, 15 Hz, and 30 W during 10 seconds); and 3) scaling and root planning before Nd:YAG laser irradiation. For the adherence test, all the specimens were immersed in brain heart infusion broth containing sucrose, inoculated with *Streptococcus mutans* GS-5 and maintained for 24 h at 37°C/5%CO₂. After the period of incubation, plating on brain heart infusion agar was performed aiming to quantify the cell adherence through counts of colonies forming units (CFU). Data were submitted by Kruskal-Wallis ANOVA e Dunn's test. The results showed significantly higher number of *Streptococcus mutans* adhered in group 2 and the lowest number in group 3. Control group showed intermediary value. It was concluded that Nd:YAG laser irradiation after scaling and root planning reduced significantly the in vitro adherence of *Streptococcus mutans* to the root surface of bovine teeth.

Keywords: Laser; *Streptococcus mutans*; dental scaling.

Introdução

O *laser* foi desenvolvido por Maiman em 1960 e, desde então, tem sido aplicado na clínica odontológica tanto em tecidos moles quanto em tecidos duros. Vários tipos de *laser* podem ser utilizados em Odontologia; no entanto, os mais comuns são o *laser* de *neodymium-yttrium-aluminum-garnet* (Nd:YAG), o de dióxido de carbono (CO₂) e o de *erbium-yttrium-aluminum-garnet* (Er:YAG). Os efeitos que os *lasers* causam nos tecidos dependem do comprimento de onda utilizado e das características de absorção do tecido. Contudo, outros aspectos, como potência utilizada, duração da exposição, delimitação do foco e distância do objeto, também interferem nos resultados a serem obtidos¹⁴.

O *laser* vem sendo utilizado com diferentes finalidades e em várias áreas da Odontologia: prevenção²⁴, endodontia²³, periodontia^{3,9,10} e dentística^{7,10}. A prevenção da cárie dentária por meio do *laser* vem recebendo grande atenção dos pesquisadores, uma vez que a área irradiada apresenta maior resistência ao ataque microbiano^{1,16}. A superfície dentinária também pode ser alterada pela energia do *laser*, tanto em relação à sua estrutura morfológica quanto à estrutura química^{5,26}. Em geral, o *laser* nos tecidos duros é utilizado para remover “*smear layer*” e “*debris*” resultantes da técnica operatória^{3,9}, para efeito bactericida^{3,11}, para selamento apical após apicetomia ou para diminuir a permeabilidade dentinária^{10,23,26}.

As superfícies radiculares podem tornar-se expostas ao meio ambiente bucal como resultado da doença periodontal, de injúrias mecânicas, de tratamento cirúrgico ou pela combinação desses fatores. Quando esse fato ocorre, essas superfícies são rapidamente colonizadas por microrganismos e freqüentemente desenvolvem lesões por cárie¹. Portanto, superfícies radiculares expostas após tratamento periodontal são fatores de risco para cárie radicular e abrasão cervical^{8,25}.

Diversos trabalhos apontam o *Streptococcus mutans* como o principal responsável pelo desenvolvimento das cáries radiculares em pacientes com doença periodontal^{4,22,25}. No entanto, a etiologia das cáries radiculares ainda não está perfeitamente esclarecida^{4,22}, e alguns autores acreditam que o processo da cárie radicular envolve não apenas dissolução do componente mineral como também ação na matriz orgânica⁴.

A irradiação com *laser* das superfícies radiculares previamente expostas à cavidade bucal por diversos motivos parece alterar a resistência do cimento à dissolução ácida². Estudos mais recentes, ao avaliarem o efeito do *laser* Nd:YAG no cimento, demonstraram que a irradiação pode ser útil na prevenção de cáries radiculares e abrasão cervical, uma vez que aumenta a dureza da superfície cementária^{2,8}, tornando-a mais resistente à ação de *Streptococcus mutans*².

Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar a aderência de *Streptococcus mutans*, após a irradiação com *laser* de Nd:YAG, em superfícies radiculares hígidas ou previamente tratadas com raspagem e alisamento radicular.

Material e método

Foram utilizados neste estudo 12 dentes anteriores bovinos. Assim que extraídos, os dentes foram armazenados em solução salina estéril e mantidos a - 4°C. Posteriormente, a polpa dentária foi extirpada com lima endodôntica tipo Kerr (Dentsply-Maillefer, Petrópolis, RJ, Brazil), e o canal radicular foi instrumentado para seu completo esvaziamento e irrigado com solução salina fisiológica. Os ápices dentários foram selados com resina fotopolimerizável, e as raízes incluídas em resina acrílica incolor e vazadas em matriz de silicone para a confecção das amostras. Após, em todos os dentes, foi delimitada uma área de 4 mm x 4 mm na região de cimento das faces mesial e distal para identificar a área a ser tratada. Em seguida, as raízes foram seccionadas para que não houvesse interferência da irradiação com *laser* na face oposta do dente que não estava sendo irradiada. A partir dessa etapa, os dentes foram divididos aleatoriamente em três grupos de oito espécimes: 1) grupo controle (G1), no qual não foi realizado tratamento; 2) grupo irradiado com *laser* de Nd:YAG (G2) com 200 mJ, 15 Hz e 30 W durante dez segundos; e 3) grupo tratado com raspagem e alisamento radicular previamente à irradiação com *laser* Nd:YAG (G3) com 200 mJ, 15 Hz e 30 W durante dez segundos.

A aplicação do *laser* foi realizada utilizando-se o aparelho P. Master 600IQ (American Dental Technologies, Inc., Corpus Christi-Texas-EUA) e sistema de entrega por fibra óptica com diâmetro de 320 µm posicionada paralelamente à raiz. Foram realizados movimentos oscilatórios durante dez segundos, percorrendo, em contato, toda a superfície delimitada. O tratamento de raspagem e o alisamento radicular executado nos dentes do Grupo 3 foram realizados apenas com cureta Gracey (9/10 da Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). As superfícies foram raspadas com movimentos realizados no sentido apical para cervical, tendo, em cada face, mesial e distal, sido executados 20 movimentos. Ao término dos procedimentos de raspagem e alisamento radicular, as superfícies foram observadas em lupa estereoscópica e apresentavam-se lisas, brilhantes e provavelmente sem cimento. Após a realização dos tratamentos, as amostras foram lavadas com solução salina e mantidas em tubos de ensaio contendo solução salina esterilizada.

A seguir, cada amostra foi posicionada em um orifício de uma placa estéril de 24 furos para cultura de células, sendo, em cada orifício, adicionado 2 mL de caldo sacarosado (Gibbons, Nygaard⁶) no qual foi semeado *Streptococcus mutans* GS-5. A placa foi fechada, colocada em recipiente lacrado e incubada em estufa à temperatura de 37°C com 5% de CO₂. Após 24 horas, as amostras foram retiradas da placa

em ambiente estéril e colocadas separadamente em tubos de ensaio contendo 2 mL de solução salina e pérolas de vidro. Esses tubos foram agitados (Vortex AP 56 – PHOENIX) com a finalidade de destacar a placa de microrganismos aderida à sua superfície. Posteriormente ao procedimento de agitação, realizou-se a diluição⁸ a base de 10 até a diluição de 10⁻⁵. Para cada diluição dos espécimes (10⁻¹ a 10⁻⁵), foi removido 0,1 mL de solução para a semeadura em placas de Petri descartáveis contendo ágar infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion, BHI, Difco). As placas foram levadas à estufa de CO₂ a 37°C em recipiente lacrado, sendo retiradas após 24 horas. As colônias bacterianas foram contadas em aparelho contador de colônias (PHOENIX CP-600), obtendo-se UFC/mL.

Os dados obtidos na contagem foram submetidos ao teste estatístico ANOVA de Kruskal-Wallis e ao Teste de Comparação Múltipla de Dunn, ao nível de significância de 5%.

Resultado

Em todos os grupos, foram observadas colônias bacterianas de *Streptococcus mutans*. Os resultados obtidos a partir da contagem de unidades formadoras de colônias foram submetidos ao teste estatístico ANOVA de Kruskal-Wallis e ao Teste de Comparação Múltipla de Dunn e mostraram que os valores medianos dos Grupos 2 e 3 apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). O Grupo 3, tratado previamente com raspagem e alisamento radicular e posteriormente irradiado com laser, exibiu menor aderência de *Streptococcus mutans* quando comparado ao Grupo 2, que recebeu apenas a irradiação. O Grupo 1 não exibiu diferença estatística com relação aos outros grupos. Os resultados são apresentados na Tabela 1 e na Figura 1.

Discussão

Acredita-se que a etiologia da cárie radicular seja semelhante à da cárie de esmalte, embora as cáries radiculares pareçam ser mais complexas devido à alta susceptibilidade das raízes expostas à desmineralização^{4,25}. Quiryren et al. sugeriram que raízes expostas são menos resistentes às espécies cariogênicas¹⁸; portanto, superfícies radiculares expostas após o tratamento periodontal são consideradas fatores de risco para cáries radiculares^{20,19}.

Tabela 1. Média e desvio padrão (DP) de UFC/mL de *Streptococcus mutans* aderidos na superfície radicular dos dentes

Tratamento	Média ± DP
Controle – G1	1,47 ± 0,93
Laser – G2	2,35 ± 1,09*
Raspagem + Laser – G3	0,95 ± 0,35

*Diferença estatisticamente significativa comparado ao Grupo 3.

Diversos estudos têm relatado aumentada susceptibilidade para cáries radiculares^{19,20} após terapia periodontal¹⁸⁻²¹. A presença de recessão gengival, na maioria dos casos causada por periodontite e/ou tratamento da mesma, é considerada um pré-requisito para o desenvolvimento de lesões por cárie nas superfícies radiculares, mas não um fator causal¹⁹.

A presença de *Streptococcus mutans* em pacientes tratados ou não periodontalmente não foi ainda bem relatada na literatura; se bem que, o sulco subgengival embora possa ser um habitat para esse microrganismo²⁵. Ravald et al.²⁰ relataram que 50% dos pacientes que receberam tratamento periodontal apresentaram uma ou mais lesões por cárie radicular clinicamente ativa. Reiker et al.²¹ verificaram que a maior quantidade de lesões cariosas foi observada em pacientes com quantidade maior que 10⁶ UFC/mL de *Streptococcus mutans* na saliva. Contudo, alguns indivíduos podem apresentar risco maior para o desenvolvimento dessas cáries, e as principais variáveis a serem avaliadas são os níveis de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* na saliva¹⁸⁻²⁰, o índice de placa bacteriana presente^{20,21}, a dieta alimentar do paciente²⁰ e a idade avançada¹⁹. Entretanto, nenhuma variável isolada é suficiente para ser preditora de desenvolvimento de cárie radicular²⁰. Pacientes que foram tratados da doença periodontal avançada e obtiveram sucesso podem exibir baixo risco para o desenvolvimento de cáries radiculares devido aos cuidados com a higiene oral¹⁹.

Neste experimento, a irradiação com laser Nd:YAG utilizando potência de 200 mJ, 30 W e frequência de 15 Hz, durante dez segundos após o tratamento de raspagem e alisamento radicular interferiu na aderência in vitro de *Streptococcus mutans* à superfície radicular de dentes bovinos.

A irradiação com laser das superfícies radiculares previamente expostas por diversos motivos parece alterar

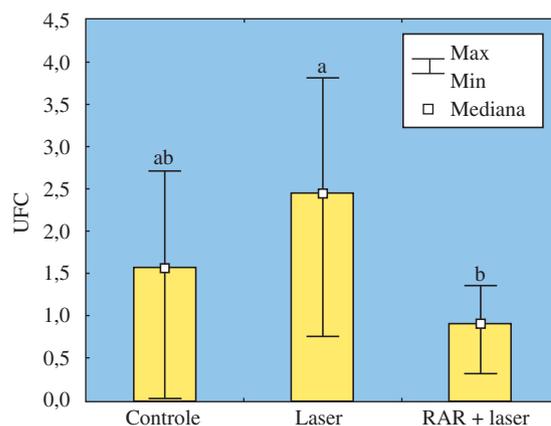


Figura 1. Gráfico da mediana da aderência de *Streptococcus mutans* na superfície radicular dos dentes (UFC/mL).

a resistência do cimento à dissolução ácida². No entanto, o cimento apresenta estrutura diferente do esmalte e contém maior quantidade de água e componentes orgânicos, sendo necessário o estudo da interação do cimento-*laser* a fim de se verificar se o *laser* pode ser utilizado como método auxiliar na prevenção de cárie radicular¹². Estudos mais recentes que avaliaram o efeito do *laser* Nd:YAG em cimento, concluíram que a irradiação pode ser útil na prevenção de cáries radiculares e abrasão cervical, uma vez que aumenta a dureza da superfície^{2,8} tornando-a mais resistente à ação de *Streptococcus mutans*².

Estudos utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) a fim de avaliar os aspectos da dentina irradiada com *laser* Nd:YAG mostraram fusão, solidificação e recristalização do tecido duro^{2,3,17,23,26}, fechamento dos túbulos dentinários^{3,5,26}, ausência de fendas na superfície^{13,26}. A fusão e a solidificação da dentina parecem ser a causa da diminuição da permeabilidade dentinária^{23,26}, reduzindo a hipersensibilidade dentinária^{16,26}. O *laser* Nd:YAG também pode ser utilizado com a finalidade de eliminar dor pós-operatória, auxiliar coagulação sanguínea¹⁵, dessensibilizar a superfície radicular^{15,16,26}, alterar a microbiota presente, vaporizar placa e cálculos³. A irradiação com *laser* Nd:YAG promove fechamento dos túbulos dentinários^{3,5,26}, e esse selamento faz com que a área fique mais resistente à penetração de microrganismos⁵.

Neste estudo o grupo tratado apenas com o *laser* apresentou maior aderência de *Streptococcus mutans*. Esse aspecto pode ser explicado pelo fato de a irradiação causar alterações na topografia da superfície, como fusão e resolidificação da estrutura dentinária, por vezes tornando-a mais rugosa^{3,26}, e também alterações na estrutura cementária. O cimento radicular após aplicação de *laser* Nd:YAG apresentou áreas de pequenas depressões e discretas elevações quando observado em MEV¹², característica que pode conduzir a uma maior aderência de microrganismos nessa superfície. Entretanto, o grupo previamente raspado e alisado exibiu menor número de microrganismos aderidos, uma vez que o tratamento com raspagem deixou a superfície mais lisa, possivelmente minimizando essas alterações.

A potência e o tempo de exposição utilizados com o *laser* são fatores que interferem diretamente na alteração da topografia radicular. Baixas potências e curto tempo de exposição podem produzir superfícies relativamente regulares, com poucas alterações consideráveis³. No presente estudo, o tempo de exposição foi extremamente curto, apenas dez segundos de aplicação; portanto, provavelmente não houve grandes modificações na topografia da superfície. Contudo, o resultado do trabalho indicou que o grupo apenas irradiado pareceu possuir mais irregularidades que os demais grupos, resultando em maior quantidade de microrganismos aderidos. Em contrapartida, o grupo que recebeu tratamento de raspagem e alisamento radicular previamente

à irradiação com *laser* exibiu superfície mais lisa do que a do grupo controle, conduzindo a uma menor aderência de *Streptococcus mutans*. Este fato ocorreu provavelmente porque a raspagem e o alisamento radicular conduzem à exposição de túbulos dentinários. Essa nova superfície que contém pequenas irregularidades e dentina exposta, ao ser submetida à ação do *laser*, sofre derretimento e recristalização, regularizando ainda mais a superfície radicular e reduzindo a fixação do microrganismo.

Com base neste estudo, concluiu-se que a irradiação com *laser* de Nd:YAG interferiu na aderência de *Streptococcus mutans* à superfície radicular de dentes bovinos. O Grupo 3 previamente raspado apresentou menor aderência de microrganismos, provavelmente por causa da maior lisura da sua superfície. Portanto, o tratamento de raspagem e o alisamento radicular poderiam ser acompanhados por irradiação com *laser*, visando regularizar, pela sua ação, a superfície radicular e suas rugosidades deixadas pela raspagem, obtendo assim uma região com maior resistência e lisura dentinária, as quais dificultam a fixação dos microrganismos.

Referências

1. Bahar A, Tagomori S. The effect of normal pulsed Nd:YAG laser irradiation on pits and fissures in human teeth. *Caries Res.* 1994; 28: 460-7.
2. L'astorina C. Estudo in vitro do efeito do laser de Nd:YAG sobre o cimento dental humano: análise por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1998.
3. Cobb C, McCawley TK, Killoy WJ. A preliminary study on the effects of the Nd:YAG on root surfaces and subgingival microflora in vivo. *J Periodontol.* 1992; 63: 701-7.
4. Dung Ts-Z, Liu Ah-H. Molecular pathogenesis of root dentin caries. *Oral Dis.* 1999; 5: 92-9.
5. Gaspirc B, Skaleric U. Morphology, chemical structure and diffusion processes of root surface after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 508-16.
6. Gibbons RJ, Nygaard M. Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming Streptococci. *Arch Oral Biol.* 1968; 13: 1249-62.
7. Gonzalez CD, Zakariasen KL, Dederich DN, Pruhs RJ. Potential preventive and therapeutic hard-tissue applications of CO₂, Nd:YAG and argon lasers in dentistry: a review. *J Dent Child.* 1996; 63: 196-207.
8. Hao KY, Kim BO, Ahm JH. Effect of Nd:YAG laser irradiation on microhardness of root surface [abstract 1755]. *J Dent Res.* 1997; 76: 233.
9. Ito K, Nishikata J, Murai S. Effects of Nd:YAG laser radiation on removal of a root surface *smear layer* after

- root planing: a scanning electron microscopic study. *J Periodontol.* 1993; 64: 547-52.
10. Kerns DG, Scheidt MJ, Pashley DH, Horner JA, Strong SL, Van Dyke TE. Dentinal tubule occlusion and root hypersensitivity. *J Periodontol.* 1991; 62: 421-6.
 11. Koba K, Kimura Y, Matsumoto K, Takeuchi T, Ikarugi T, Shimizu T. A histopathological study of the morphological changes at the apical seat and in the periapical region after irradiation with a pulsed Nd:YAG laser. *Int Endod J.* 1998; 31: 415-20.
 12. Lee CP, Lemire DR, Cobb CM. Effects of CO₂ laser irradiation on tooth-root cementum. *Gen Dent.* 1997; 45: 276-81.
 13. Liu HC, Lin CP, Lan WH. Sealing depth of Nd:YAG laser on human dentinal tubules. *J Endod.* 1997; 23: 691-3.
 14. MYERS, M.L. The effect of laser irradiation on oral tissues. *J Prosthet Dent.* 1991; 66: 395-7.
 15. Myers TD. Lasers in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 1991; 122: 47-50.
 16. Nammour S, Renneboog-Squilbin C, Nyssen-Behets C. Increased resistance to artificial caries-like lesions in dentin treated with CO₂ laser. *Caries Res.* 1992; 26: 170-5.
 17. Pelino JE, Mello JB, Eduardo CP, Jorge AO. In vitro study of the Nd:YAG laser effect on human dental enamel: optical and scanning electron microscope analysis. *J Clin Laser Med Surg.* 1999; 17: 171-7.
 18. Quirynen M, Gizani S, Mongardini C, Declerck D, Vinckier F, Van Steenberghe D. The effect of periodontal therapy on the number of cariogenic bacteria in different intra-oral niches. *J Clin Periodontol.* 1999; 26: 322-7.
 19. Raval N, Hamp S-E. Prediction of root surface caries in patients treated for advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1981; 8: 400-14.
 20. Raval N, Birkehed D, Hamp S-E. Root caries susceptibility in periodontally treated patients. *J Clin Periodontol.* 1993; 20: 124-9.
 21. Reiker J, van der Velden U, Barendregt DS, Loos BG. A cross-sectional study into the prevalence of root caries in periodontal maintenance patients. *J Clin Periodontol.* 1999; 26: 26-32.
 22. Schüpbach P, Osterwalder V, Guggenheim B. Human root caries: microbiota of a limited number of root caries lesions. *Caries Res.* 1996; 30: 52-64.
 23. Stabholz A, Khayat A, Weeks DA, Neev J, Torabinjad M. Scanning electron microscopic study of the apical dentine surfaces lased with Nd:YAG laser following apicectomy and retrofill. *Int Endod J.* 1992; 25: 288-91.
 24. Tagomori S, Morioka T. Combined effects of laser and fluoride on acid resistance of human dental enamel. *Caries Res.* 1989; 23: 225-31.
 25. Van der Reijden WA, Dellelijn-Kippuw N, Stijne-van Nes AM, de Soet JJ, van Winkelhoff AJ. *Mutans streptococci* in subgingival plaque of treated and untreated patients with periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 686-91.
 26. White JM, Goodis HE, Rose CM. Nd:YAG pulsed infrared laser for treatment of root surface. *J Calif Dent Assoc.* 1991; 19 (11): 55-8.

